

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM
BIOENERGIA – NÍVEL DE MESTRADO

BIORREMEDIAÇÃO DA ÁGUA DE BIODIESEL UTILIZANDO LIPASE FÚNGICA DE
Penicillium sumatrense

ALINE DANIELLY AWADALLAK

TOLEDO
SETEMBRO\ 2018

ALINE DANIELLY AWADALLAK

BIORREMEDIAÇÃO DA ÁGUA DE BIODIESEL UTILIZANDO LIPASE FÚNGICA DE
Penicillium sumatrense

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Professora Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues

TOLEDO
SETEMBRO \ 2018

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	VI
AGRADECIMENTO.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABRSTACT.....	IX
INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. BIODIESEL	3
2.1.1. Histórico.....	3
2.1.2. Matéria prima para produção de biodiesel	5
2.1.3. Produção de biodiesel.....	8
2.1.4. Purificação do biodiesel	11
2.2. ENZIMAS.....	12
2.2.1. Lipases.....	13
2.3. BIORREMEDIAÇÃO	17
2.3.1. Intrínseca.....	18
2.3.2. Bioestimulação	18
2.3.3. Bioaugmentação	19
2.3.4. Air sparging.....	19
2.3.5. Bioventilação.....	20
2.4. PARÂMETROS DA QUALIDADE DA ÁGUA	20
2.4.1. Parâmetros físicos	21
2.4.2. Parâmetros químicos	23
3. JUSTIFICATIVA PARA A ESCOLHA DO MICRORGANISMO	27
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30

4.1. REAGENTES.....	30
4.2. MICRORGANISMO.....	30
4.3. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS.....	30
4.4. ESTOQUE E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS	30
4.5. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS	31
4.5.1. Determinação do teor de Umidade.....	31
4.5.2. Determinação do teor de Cinzas.....	31
4.5.3. Determinação do teor de Óleo.....	31
4.6. PRODUÇÃO DA LIPASE.....	32
4.6.1. Preparação dos Substratos.....	32
4.6.2. Condições de Cultivo no Meio Sólido	32
4.6.3. Secagem do Sólido Fermentado.....	33
4.7. EFLUENTE	33
4.7.1. Caracterização do Efluente.....	33
4.8. BIORREMEDIAÇÃO	34
4.8.1. Adição Direta do Material Fermentado	34
4.9. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	35
4.9.1. Determinação de Atividade Lipolítica- Método Titulométrico.....	35
4.9.2. Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	36
4.9.3. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	Erro! Indicador não definido.
4.9.4. Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio em 5 dias (DBO ₅).....	Erro! Indicador não definido.
4.9.5. Determinação de sólidos totais (ST)	Erro! Indicador não definido.
4.9.6. Determinação de óleos e graxas (O&G).....	Erro! Indicador não definido.
4.9.7. Turbidez	Erro! Indicador não definido.
4.9.8. pH.....	Erro! Indicador não definido.
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO	37
5.2. ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES DE <i>Penicillium sumatrense</i> POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	37

5.2.1. Cinética de Produção da Enzima.....	37
5.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	40
5.3. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE.....	41
5.4. BIORREMEDIAÇÃO DO EFLUENTE DE BIODIESEL.....	41
5.4.1. Determinação da Demanda química de oxigênio (DQO).....	42
5.4.2. Determinação da Demanda bioquímica de oxigênio (DBO ₅).....	44
5.4.3. Determinação da razão de biodegradabilidade do efluente (DBO ₅ / DQO).....	45
5.4.4. Determinação de Sólidos Totais (ST).....	46
5.4.4. Determinação de Óleos e graxas (O&G).....	47
5.4.5. Determinação da Turbidez.....	48
5.4.7. Determinação do pH.....	50
6. CONCLUSÕES.....	50
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	52
8. REFERÊNCIAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Oleaginosas no Território Nacional para Produção de Biodiesel. Fonte: Associação Brasileira das indústrias de Óleos Vegetais	6
Figura 2 Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel no Brasil – 2006 a 2015. Fonte: ANP (2016).....	7
Figura 3 Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel - Perfil Nacional (Maio, 2015). Fonte: ANP, 2015.....	8
Figura 4. Reação de transesterificação Fonte: SUAREZ <i>et al.</i> , 2007	10
Figura 5 Reações de hidrólise de um triacilglicerol catalisadas por lipase. Fonte: FUREBY <i>et al.</i> , 1997.....	14
Figura 6 Cinética de produção de lipase fúngica de <i>Penicillium sumatrense</i> por fermentação no estado sólido (FES). Os ensaios foram realizados com umidade de 60 %. Experimentos realizados em triplicata com temperatura de 27°C.....	38
Figura 7. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) do substrato após a fermentação (A) e antes da fermentação (B).....	40
Figura 8 Valores da Demanda química de Oxigênio (DQO) das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel com e sem biorremediação utilizando lipases de <i>Penicillium sumatrense</i> . Condições de ensaio: efluente sem biorremediação (■) e com biorremediação (■) Foram adicionados 100 mL de efluente, 678,6 U de atividade enzimática, 37 °C e 14 dias.....	48
Figura 9. Valores da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel com e sem biorremediação utilizando lipases de <i>Penicillium sumatrense</i> . Condições de ensaio: efluente sem biorremediação (■) e com biorremediação(■) Foram adicionados 100 mL de efluente, 678,6 U de atividade enzimática, 37 °C e 14 dias.....	49
Figura 10 . Valores sólidos totais (ST) das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel com e sem biorremediação utilizando lipases de <i>Penicillium sumatrense</i> . Condições de ensaio: efluente sem biorremediação (■) e com biorremediação (■). Foram adicionados 100 mL de efluente, 678,6 U de atividade enzimática, 37 °C e 30 dias.	47
Figura 11 Valores de óleos e graxas das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel sem biorremediação e com biorremediação utilizando lipases de <i>Penicillium sumatrense</i> . Condições de ensaio: efluente sem biorremediação (■) e com biorremediação(■) Foram adicionados 100 mL de efluente, 678,6 U de atividade enzimática, 37 °C e 30 dias.	43
Figura 12 Valores de Turbidez das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel com biorremediação e sem biorremediação utilizando lipases de <i>Penicillium sumatrense</i> . Condições de ensaio: efluente sem biorremediação (■) e com biorremediação (■). Foram adicionados 100 mL de efluente, 678,6 U de atividade enzimática, 37 °C e 30 dias.	45
Figura 13 Valores de pH das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel sem Biorremediação e com biorremediação com biorremediação e sem biorremediação utilizando lipases	

de *Penicillium sumatrense*. Condições de ensaio: efluente sem biorremediação (■) e com biorremediação (■). Foram adicionados 100 mL de efluente, 678,6 U de atividade enzimática, 37 °C e 30 dias..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais resíduos nos efluentes de produção de biodiesel.....	11
Tabela 2 - Aplicações industriais das lipases.	17
Tabela 3 - Nomenclatura aferida ao grau de dureza.....	24
Tabela 4 - Variáveis estudadas com os métodos de análise e a metodologia utilizada.....	34
Tabela 5 - Caracterização inicial da água residual de lavagem do biodiesel.	41
Tabela 6 - Caracterização do efluente do biodiesel após o processo de biorremediação.....	42

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Evolução biodiesel. Fonte: Imagem adaptada ANP (2017).....	5
Esquema 2: Fluxograma do Processo de Produção de Biodiesel. Fonte: PARENTE, 2003.....	9

LISTA DAS EQUAÇÕES

Equação 1 Cálculo da Atividade	35
Equação 2 Determinação Sólidos Totais.....	Erro! Indicador não definido.
Equação 3 Determinação Óleos e Graxas	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AGL	Ácidos graxos livres
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
B2	Mistura com 2 % de biodiesel e 98 % de óleo diesel mineral
B3	Mistura com 3 % de biodiesel e 98 % de óleo diesel mineral
B5	Mistura com 5 % de biodiesel e 98 % de óleo diesel mineral
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
FES	Fermentação no estado sólido
GL	Glicerol livre
H₂O	Água
IE	Índice enzimático
O&G	Óleos e graxas
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotação por minuto

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Malú, por todos estes dois anos juntas, pela amizade, companheirismo, e por sempre acreditar mais em mim, do que eu mesma.

Ao meu namorado Gustavo por todo apoio, suporte e amor nesses dois anos que seguiram.

Aos meus pais, Jamal e Lea pelo apoio e amor e por terem me dado condições para ter chegado até aqui.

Aos meus irmãos Alexandre e Jamal pelo companheirismo e momentos de diversão
Ao Atanasio e Lourdes pelo apoio e suporte nesse período.

Aos meus amigos Rayane e Rodrigo por estar sempre ao meu lado.

Aos companheiros de laboratório, Cintia , Pedro, Leonardo, Rafaela, Bruna, Monique e Karina que contribuíram para construção do trabalho, ajudando no que fosse preciso

Aos Prof. Dr. Edson Antônio da Silva, Prof. Dr, Profa. Dra. Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca, muito obrigada pela ajuda, ensinamentos, orientações e contribuições.

Á CAPES pelo auxílio e apoio concedido, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Os óleos e graxas (O&G) representam uma classe de poluentes com baixa afinidade com a água. Sua remoção de águas residuais industriais é muitas vezes desafiadora e envolve a combinação de diferentes tecnologias de tratamento convencionais, os quais, no entanto, muitas vezes apresentam desvantagens como a produção de lamas perigosas e o consumo de alta energia. Um exemplo é o setor de produção de biodiesel, onde os efluentes gerados são ricos em óleos e graxas. Buscar alternativas inovadoras de tratamento representa uma contribuição significativa para a sustentabilidade operacional e econômica no setor de biocombustíveis. Neste contexto, o pré-tratamento de águas residuais ricas em gorduras por biorremediação utilizando biocatalisadores como lipases de natureza fúngica poderá ser uma alternativa promissora, pois a produção da enzima é de baixo custo e apresenta as vantagens de biodegradabilidade (white biotechnology) e pode ser recuperada e utilizada em ciclos, reduzindo o custo operacional. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biodegradação de óleos e graxas (O&G) em efluentes de água residuária de lavagem do biodiesel, por meio de lipase fúngica de *Penicillium sumatrense* obtida através do processo de FES (Fermentação em Estado Sólido). Os resultados indicaram que após a biorremediação houve uma redução em todos os parâmetros avaliados estando de acordo com a Resolução CONAMA 430/2011. O teor de óleos e graxas reduziu 86 %; a DQO 5,0 %; a DBO 7%; de sólidos totais (ST) 84,5 % e o pH manteve-se em 5,76. A razão de biodegradabilidade do efluente (DBO_5/DQO) calculada foi de 1,30. Esta razão indica que valores menores do que 0,6 estimam baixa biodegradabilidade do efluente, portanto, o valor obtido nesta pesquisa indica uma boa biodegradabilidade do efluente estudado. Diante dos resultados obtidos verificou-se um tratamento eficiente onde as águas residuárias da indústria de produção de biodiesel poderão ser utilizadas para fins de lançamento ou reuso no processo industrial minimizando a geração de efluentes nas estações de tratamento.

Palavras-Chave: Biorremediação, lipases, efluentes de biodiesel.

ABSTRACT

Oils and greases (O&G) represent a class of pollutants with low affinity for water. Their removal of industrial wastewater is often challenging and involves the combination of different conventional treatment technologies, which, however, often present drawbacks such as the production of hazardous sludge and high energy consumption. One example is the biodiesel production sector, where the generated effluents are rich in oils and greases. Finding innovative treatment alternatives represents a significant contribution to operational and economic sustainability in the biofuels sector. In this context, the pretreatment of fat-rich waste water by bioremediation using biocatalysts as fungal lipases may be a promising alternative, since the production of the enzyme is low cost and presents the advantages of biodegradability (white biotechnology) and can be recovered and used in recycles, reducing the operational cost. The objective of this work was to evaluate the biodegradation of oils and greases (O&G) in wastewater effluents from biodiesel washing, by means of fungal lipase from *Penicillium sumatrense* obtained through the SST (Solid State Fermentation) process. The results indicated that after the bioremediation there was a reduction in all parameters evaluated, according to Resolution 430/2011 of CONAMA. The content of oils and greases decreased by 86%; to COD 5.0%; to BOD 7%; of total solids (TS) 84.5% and the pH remained at 5.76. The effluent biodegradability ratio (BOD_5 / COD) calculated was 1.30. This ratio indicates that values lower than 0.6 estimate low effluent biodegradability, therefore, the value obtained in this research indicates a good biodegradability of the studied effluent. In view of the obtained results an efficient treatment was verified where the wastewater of the biodiesel production industry could be used for the purpose of launching or reuse in the industrial process, minimizing the generation of effluents in the treatment plants.

Key words: Bioremediation, lipases, biodiesel effluents.

INTRODUÇÃO

No Brasil quase metade da energia consumida é renovável, ou seja, proveniente de recursos capazes de se regenerar em um curto período de tempo, indicando que a matriz energética brasileira em âmbito mundial é uma das mais limpas do planeta. Porém, com a crise hídrica que o país vem enfrentando a alguns anos, a eletricidade vendida aos brasileiros vem alcançando preços mais elevados a cada dia. Isso se dá por conta da utilização das termoelétricas que são movidas por combustíveis fósseis como óleo diesel e o carvão mineral (LIMA E SOUZA, 2014).

A independência e autossuficiência no setor de energia é um indicador do desenvolvimento socioeconômico de qualquer país. Por isso, nos últimos anos as pesquisas e prospecções tecnológicas têm-se voltado ao uso de fontes de energia não convencionais (BASU *et al.*, 2014). Uma alternativa são os combustíveis derivados de óleos e gorduras, chamados de biodiesel. Este combustível pode ser classificado como qualquer combustível alternativo, de natureza renovável, que possa ser empregado na substituição total ou parcial do diesel de petróleo em motores de ignição por compressão interna (motores do ciclo Diesel) (RAMOS *et al.*, 2017).

O processo de transesterificação é o mais frequentemente utilizado para produção de biodiesel. Este processo consiste na reação química de óleos vegetais ou de gordura animal com o álcool, etanol ou metanol, na presença de um catalisador básico, ácido ou enzimático. Apesar de diversas vantagens socioambientais, o aumento da produção de biodiesel acarreta no aumento de efluente gerado durante o seu processo de purificação.

A produção e purificação de biodiesel e passa por várias etapas, como a preparação da matéria-prima; preparação do catalisador; processo reacional; separação de fases; recuperação de excesso de álcool; lavagem do biodiesel; secagem do biodiesel e purificação da glicerina (BENEVIDES, 2011). Como qualquer processo de síntese gera subprodutos, como a glicerina e efluentes da lavagem do biodiesel oriundos da purificação.

Apesar de possuir vantagens socioambientais, a produção de biodiesel em grande escala pode acarretar alguns danos ao meio ambiente, como na etapa de purificação (lavagem), que gera um grande aumento do efluente. Nos métodos tradicionais são utilizados 3 litros de água para cada litro de biodiesel produzido (DE BONI *et al.*, 2007).

Segundo a resolução do Conama nº 430 de 13 de maio de 2011 Art. 3º, Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores

após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis. De acordo com a resolução torna-se necessário tratar e caracterizar as águas provenientes do processo de lavagem, a fim de serem descartadas sem causar danos aos corpos hídricos atendendo o padrão do Conama ou serem reutilizadas pela indústria.

Um processo de reutilização de águas dentro de uma indústria é altamente vantajoso, tanto sob o aspecto econômico como sob o aspecto ambiental. Entretanto, depende da disponibilidade de tecnologias de processos adequadas para sua purificação. Economicamente, a reutilização de águas residuárias permite uma diminuição de captação de água potável da rede de saneamento, o que diminuiria o custo com deste insumo. Sob o ponto de vista ambiental, é consenso à necessidade de reutilização e de evitar o desperdício.

Uma alternativa para a reutilização de águas residuárias é o tratamento de efluentes com alto teor de óleos e graxas através da biorremediação, que consiste em aplicar organismos vivos como plantas, microrganismos e enzimas, que modifiquem ou decomponham determinados poluentes. Essa técnica pode ser utilizada para derrame químico como gasolina e diesel, derrame de petróleo, decomposição de substâncias inorgânicas e orgânicas entre outros, sendo de grande importância ambiental, social e econômica, pois essa técnica consiste em degradar substâncias tóxicas do meio ambiente (COUTINHO *et al.*, 2015; JACQUES, 2010).

As lipases (triacilglicerol éster hidrolase, E.C. 3.1.1.3) são enzimas utilizadas em diversos setores industriais como na indústria química, farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. Esta classe de enzimas é capaz de catalisar a hidrólise de ésteres em meios aquosos. Em meios restritos em água catalisam as reações de aminólise, esterificação, interesterificação e transesterificação, sendo eficientes para o tratamento de efluentes (COLLA *et al.*, 2012; BON *et al.*, 2008).

Neste trabalho utilizou-se lipases fúngicas de *Penicillium sumatrense* com aplicação em processos de biorremediação do efluente de lavagem do biodiesel. A produção de enzimas, com aplicações no tratamento de efluentes, justifica plenamente este trabalho, considerando o aumento dos volumes de efluentes gerados nas indústrias, associados à crescente preocupação com os impactos ambientais e uma legislação ambiental cada vez mais rígida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIODIESEL

A resolução da ANP nº 42 de 24/11/2014, define o biodiesel como renovável e biodegradável, composto por alquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa providos de gorduras animais ou óleos vegetais, que possa substituir totalmente ou parcialmente o óleo diesel de origem fóssil.

A Lei Nacional número 11.097 de 13 de janeiro de 2005, classifica biodiesel como de natureza renovável, combustível alternativo, podendo ser agregado na substituição total ou parcial do diesel de petróleo.

O biodiesel pode ser produzido a partir de fontes renováveis, como gorduras animais e óleos vegetais, sendo uma alternativa para motores a diesel (KNOTHE, 2005; KRAWCZYK, 1996). O biodiesel é um biocombustível, biodegradável, atóxico, constituído de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos a partir da reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo com um álcool de cadeia curta, metanol ou etanol, respectivamente (PARENTE, 2003).

O biodiesel está sendo cada vez mais utilizado no abastecimento de diesel em todo o mundo, uma vez que é uma opção ambientalmente correta, além de melhorar o desempenho do motor diesel (LUQUE & MELERO, 2012).

No Brasil a mistura de biodiesel com diesel fóssil teve início em dezembro de 2004. Em janeiro de 2008 passou ser obrigatória a mistura de 2% do biodiesel, em janeiro de 2010 o percentual da mistura passou a ser de 5% (ANP, 2016).

2.1.1. Histórico

No final do século XIX, o engenheiro Rudolph Diesel, desenvolveu um motor que funcionava a base de óleos vegetais. Em uma exposição em Paris, em 1889 foi demonstrado o funcionamento de um protótipo com motor diesel com o óleo de amendoim (GAZZONI, 2008).

O processo de transesterificação, que melhora o processo de combustão no interior do motor e diminui a viscosidade do óleo vegetal foi descoberto em 1937, pelo cientista belga G. Chavenne (KNOTHE, 2001).

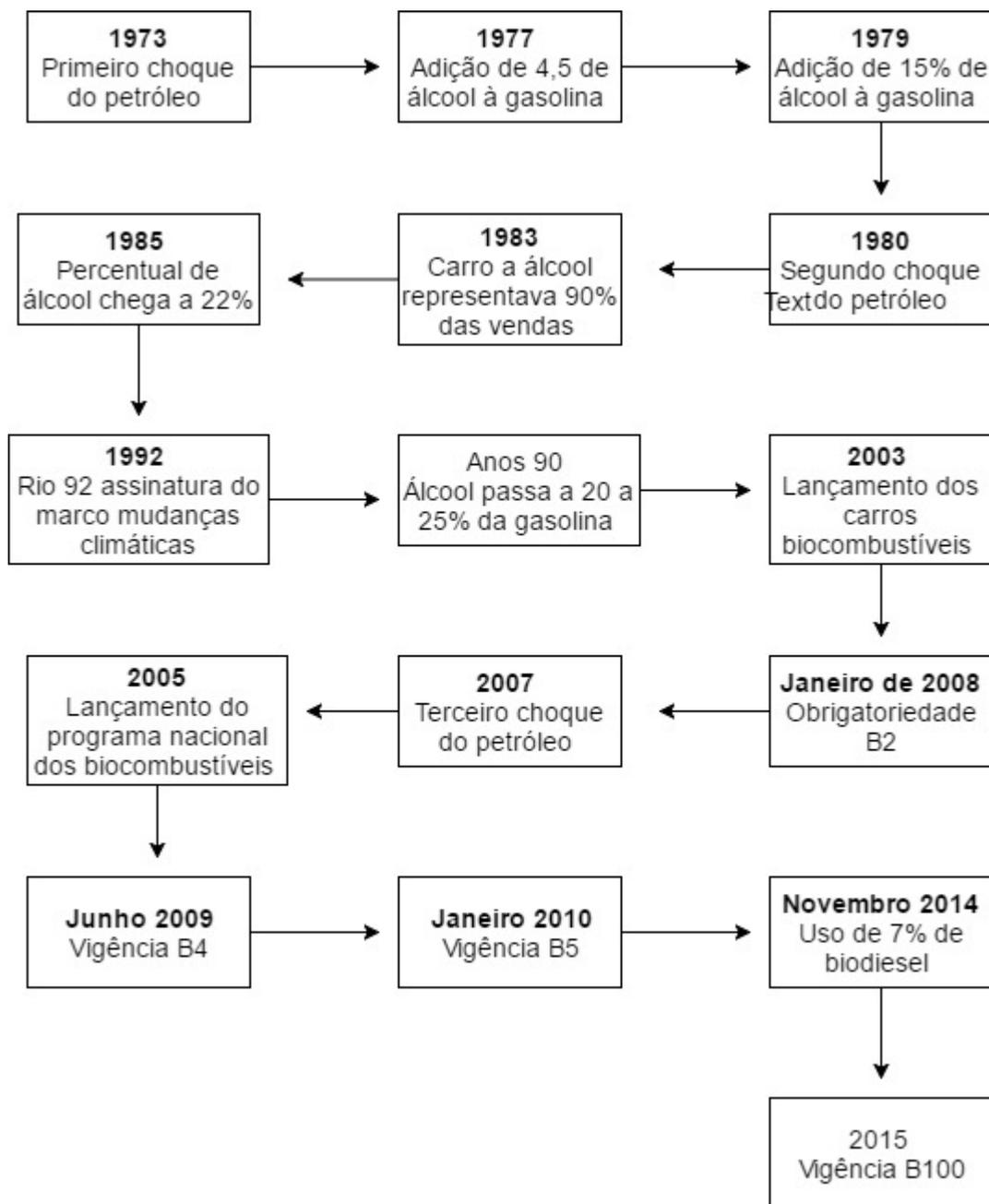
Durante a II Guerra Mundial, o biocombustível foi bastante utilizado por alguns países como, Índia, China e Bélgica. Em 1941 aconteceu o primeiro teste utilizando biocombustível, em um linha de ônibus que fazia Bruxelas – Louvain (KNOTHE, 2001).

Em 1973, com a crise do petróleo no Brasil foi criado o PROALCOOL (Programa Nacional do Álcool), tornando-se referência no programa de biomassa, no uso de etanol como biocombustível (MOREIRA & GOLDEMBERG, 1999). Ainda na década de 70 foi criado o PRO-ÓLEO, onde se esperava a substituição de até 30% do diesel de petróleo, porém em meados da década de 80 o projeto foi abandonado (POUSA; SANTOS & SUAREZ, 2007).

Em janeiro de 2005, o biodiesel foi regulamentando na matriz energética brasileira pela lei Lei nº 11.097 publicada no Diário Oficial da União em 13/01/2005.

A proporção de biodiesel adicionada ao óleo diesel passou a ser de 6% a partir de julho e de 7% a partir de novembro de 2014, conforme a Lei nº 13.033/2014. Em 2015, a capacidade nominal para produção de biodiesel (B100) no Brasil era de cerca de 7,4 milhões de m³ (20,4 mil m³/dia). Entretanto, a produção nacional foi de 3,9 milhões de m³, o que correspondeu a 53,3% da capacidade total (ANP, 2016).

O esquema 1 mostra a evolução do biodiesel no Brasil.



Esquema 1 Evolução biodiesel. **Fonte:** Imagem adaptada ANP (2017).

2.1.2. Matéria prima para produção de biodiesel

O Brasil possui uma grande diversidade de matérias-primas para a produção de biodiesel e dentre as fontes de produção de biodiesel, os óleos vegetais têm sido uma alternativa viável. As opções de fontes de matéria-prima para produção dos combustíveis renováveis são bem diversificadas. Podemos citar como exemplos os óleos vegetais, óleos usados, gorduras de animais, gorduras residuais e microalgas. Diante de toda diversidade é

necessário levar em consideração as características da regionalização como escala periódica sazonalidade e porcentagem de óleo na planta (CANDEIA, 2008).

Podemos observar na Figura 1, que cada região tem diferentes culturas para produção de biodiesel.



Figura 1: Oleaginosas no Território Nacional para Produção de Biodiesel. **Fonte:** Associação Brasileira das indústrias de Óleos Vegetais

Mesmo com as diversidades de oleaginosa em todo território nacional, na Figura 2 é possível notar que o óleo de soja é o principal para a produção de biodiesel.

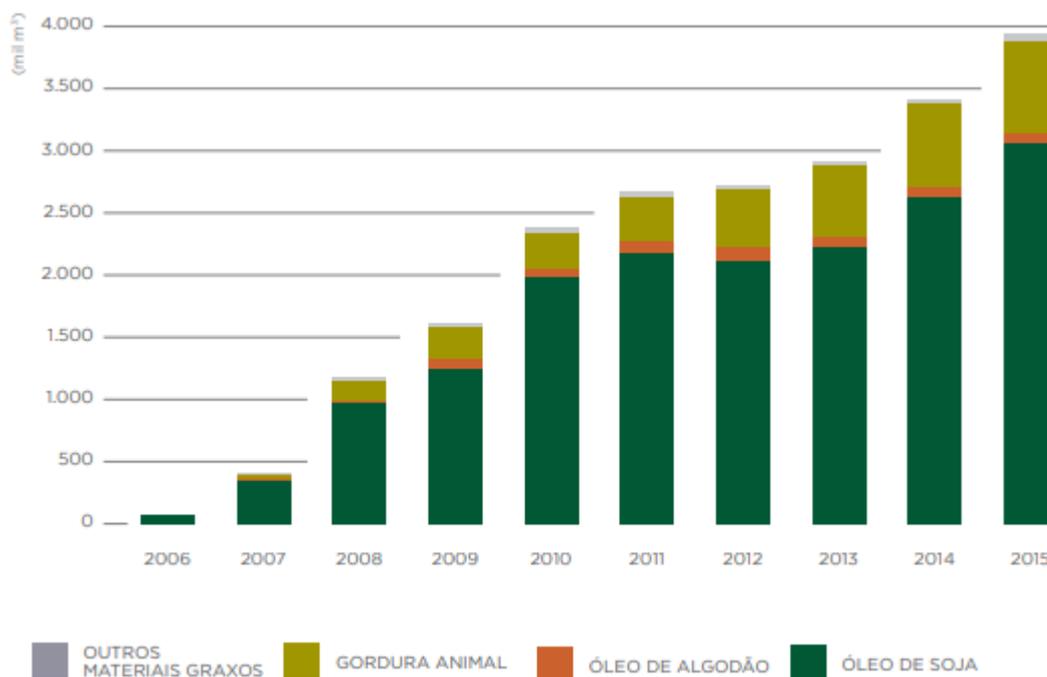


Figura 2 Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel no Brasil – 2006 a 2015. **Fonte:** ANP (2016).

A justificativa para a soja ser a principal matéria-prima na produção de biodiesel é em virtude do menor custo, pois o óleo de soja é produzido a partir do subproduto da produção do farelo de soja para exportação, tornando-se um dos líderes mundiais no mercado de óleos vegetais. Em segundo lugar podemos citar a gordura animal, que é subproduto da produção de carne no Brasil (SALLET, 2011).

Na Figura 3 é possível analisar a porcentagem em relação as matérias-primas utilizadas para a produção do biodiesel no ano de 2015.

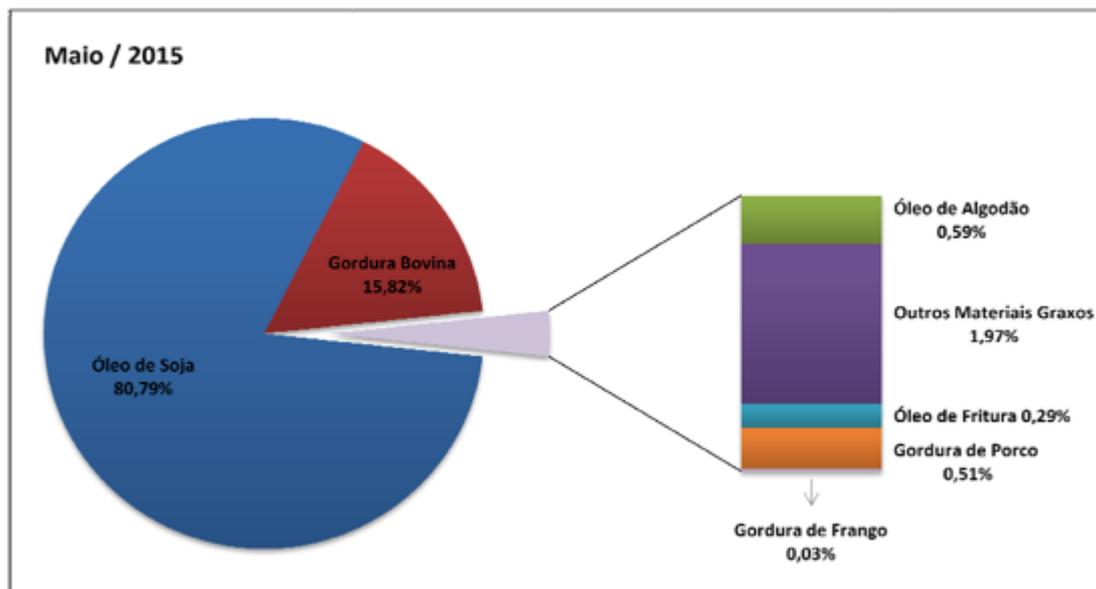


Figura 3 Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel - Perfil Nacional (Maio, 2015).

Fonte: ANP, 2015.

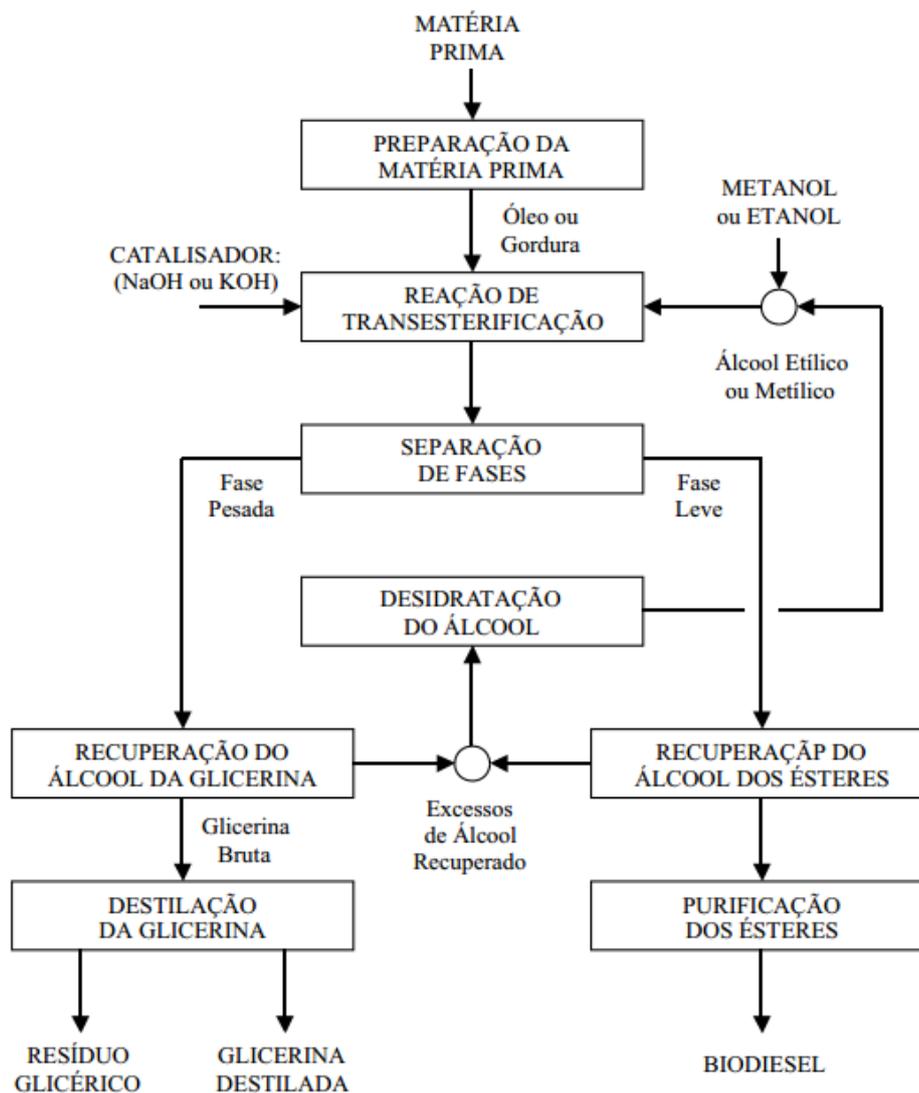
Na Figura 3 é possível notar que o óleo de soja é a matéria-prima mais utilizada (80,79%) na produção de biodiesel, conforme justificado anteriormente.

2.1.3. Produção de biodiesel

O processo de produção de biodiesel pode ser feito por transesterificação, esterificação e hidroesterificação. A transesterificação é o processo mais comum, pois leva a produção de biodiesel, isto é, ésteres alquílicos de óleos e gorduras (KNOTHE *et al.*, 2005).

Como matérias-primas, podem ser utilizados diferentes óleos e gorduras de origem vegetal ou animal. Além de óleos vegetais e gordura animal, outras matérias-primas como óleos utilizados para a cocção de alimentos (fritura) também são adequados para a produção de biodiesel, no entanto a mudança no procedimento de reação são frequentemente necessárias devido à presença de água e ácidos graxos livres (AGL) (RAMOS *et al.*, 2017).

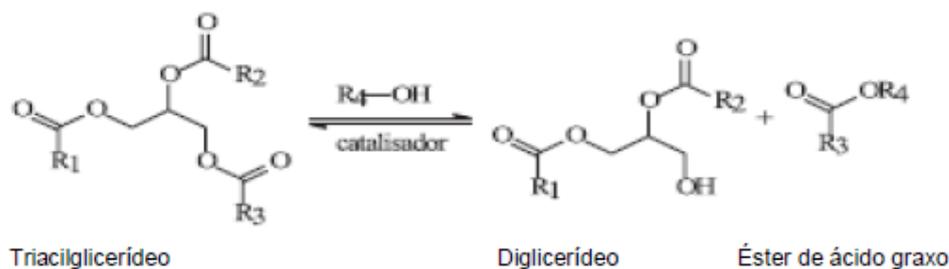
O processo de produção de biodiesel através da reação de transesterificação, partindo de uma matéria-prima graxa qualquer, envolve várias etapas operacionais mostradas no fluxograma (Esquema 2) proposto por PARENTE (2003).



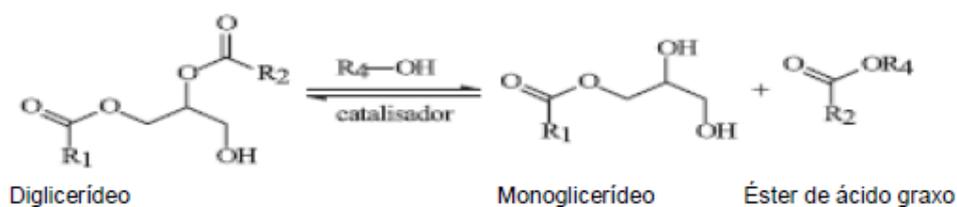
Esquema 2: Fluxograma do Processo de Produção de Biodiesel. **Fonte:** PARENTE, 2003

A reação de transesterificação ou alcoólise é a reação química na qual um triglicerídeo (óleo ou gordura) reage com um álcool na presença de um catalisador químico (NaOH, KOH) ou enzimático (lipases) para formar, ésteres monoalquílicos (biodiesel) e glicerol. O álcool usualmente é o metanol ou o etanol, resultando em ésteres metílicos ou etílicos, respectivamente.

1ª Etapa:



2ª Etapa:



3ª Etapa:

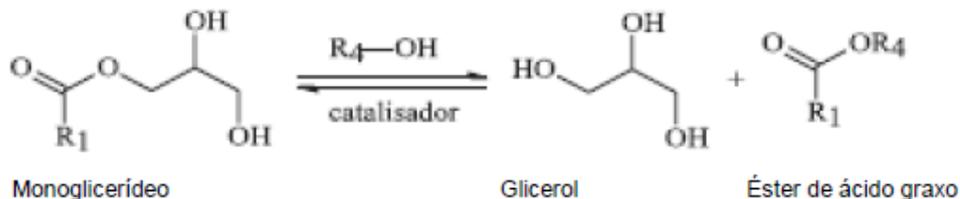


Figura 4. Reação de transesterificação **Fonte:** SUAREZ *et al.*, 2007

O catalisador escolhido é de suma importância, pois é a partir dele que serão estabelecidas as características do processo empregado, como a temperatura da reação e a separação do biodiesel da glicerina, dentre outros (SUAREZ *et al.*, 2009; KNOTHE *et al.*, 2006).

Existem quatro tipos de catalisadores utilizados na transesterificação dos triacilgliceróis, como os catalisadores ácidos ou básicos, homogêneos, heterogêneos ou biológicos. Como catalisador biológico são utilizadas enzimas, que são de elevada eficiência catalítica, em geral muito maior que os catalisadores sintéticos, pois têm alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas e, em alguns casos, podem funcionar tanto em solventes orgânicos quanto em soluções aquosas. Grande parte do poder catalítico das enzimas deve-se à capacidade delas interagirem com o substrato em orientações favoráveis na formação dos complexos enzima-substrato (ES) (RAMNATH, SITHOLE & GOVINDEN, 2016; XIANGHAI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2011; ROSSET, 2011; GAMBA 2009).

2.1.4. Purificação do biodiesel

Após o processo de transesterificação, neutralização, evaporação do álcool e centrifugação ou decantação do glicerol, o biodiesel ainda pode estar contaminado com ácidos graxos livres, glicerol livre (GL), glicerídeos, sabão, água, álcool e catalisador. Os resíduos, mesmo em níveis baixos podem influenciar na qualidade do biodiesel conforme demonstrado na Tabela 1 (ATADASHI *et al.*, 2011; KNOTHE *et al.*, 2005).

Tabela 1- Principais resíduos nos efluentes de produção de biodiesel

Contaminante	Efeito
Água	Reduz o calor de combustão; aumenta a corrosão de metais, causa hidrólise do biodiesel com formação de ácidos graxos livres.
Catalisador/sabão	Causa entupimento dos bicos injetores; problemas de corrosão nos motores e entupimento de filtros.
Glicerídeos	Causa cristalização; turbidez no biodiesel; maior viscosidade; formação de depósitos em pistões, válvulas e bocais de injeção.
Glicerol	Forma duas fases no biodiesel após a decantação; emissão mais elevada de aldeídos e acroleína (substância tóxica).
Metanol	Causa degradação de peças de borracha e juntas; abaixa o ponto de fulgor, aumenta a corrosão de peças de alumínio e zinco.

Fonte: ATADASHI *et al.*, 2011.

Para remover as impurezas que ainda restam no biodiesel é necessário realizar uma etapa de purificação. Dentre os métodos utilizados, a lavagem aquosa é o método mais tradicional de purificação de biodiesel. Esta etapa produz um grande volume de efluentes. Neste método adiciona-se água quente à mistura do biodiesel bruto, com agitação lenta para evitar-se a formação de emulsões. Em seguida, a mistura é deixada em repouso até obter-se boa separação de fases por decantação, o que pode ocorrer em 2 horas. As duas fases obtidas são separadas por funil de separação. O processo é repetido até obter-se água de lavagem incolor, e os resíduos de água são removidos do biodiesel após a última repetição de lavagem, por processos de destilação e evaporação (PICCIN *et al.*, 2015; CAVALLARI, 2012).

Para que ocorra essa purificação pelo método de lavagem utilizam-se em média 10 litros de água para purificar um litro de biodiesel. Os efluentes provenientes do processo

apresentam-se quimicamente inadequados para serem lançados a qualquer corpo hídrico (DE BONI *et al.*, 2007). Esses efluentes contêm basicamente resíduos de sabões de sódio ou potássio, além dos ácidos graxos e glicerina. Esse processo é conhecido pelo grande consumo de água, tendo contribuições negativas para o meio ambiente, gerando uma grande preocupação com o descarte (ATADASHI *et al.*, 2011; SABUDAK *et al.*, 2010).

De acordo com a resolução do Conama 430/2011, Art. 3, os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente nos corpos de água, após o devido tratamento e, desde que obedeçam as condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis.

A lavagem a seco remove os contaminantes do biodiesel por adsorção ou através de um leito de resina de troca iônica, que tem a vantagem de produzir um volume pequeno de efluente, utiliza menos espaço que a lavagem úmida e diminui o tempo de produção. Porém, o uso de resinas de troca iônica não atinge as especificações de pureza, além dos custos elevados e a regeneração das resinas de troca iônica não ser recomendada (SANTOS, 2014).

2.2. ENZIMAS

As enzimas são de elevada importância nos processos biológicos. Elas são catalizadores biológicos, que participam de várias reações bioquímicas, tendo como papel fundamental o controle metabólico. Estas moléculas aceleram reações, sendo extremamente versáteis, podendo ser utilizadas para substituir catalisadores químicos como ácidos e compostos cáusticos, que agridem o meio ambiente (ROCHA 2010; COELHO *et al.*, 2008). As enzimas podem ser obtidas através de fontes vegetais, animais e microbianas, presente em diversos processos industriais como nas indústrias papel e celulose, alimentos, bebidas, detergentes, roupas, têxtil, medicamentos e mais recentemente, na produção de biocombustíveis, como o biodiesel e o bioetanol (RAMNATH, SITHOLE & GOVINDEN, 2016; MONTEIRO, 2009).

As enzimas são muito importantes nas indústrias de processamento de alimentos. Algumas das maiores aplicações industriais incluem a produção de xarope de milho, clarificação de bebidas, cervejaria, panificação, tenderização de carne, e preparação de leite deslactosado para pessoas com intolerância à lactose (DAVIDS *et al.*, 2013). As enzimas também são utilizadas na agricultura, no processo de silagem como alimento. A fermentação

reduz o pH da silagem, inibindo o crescimento de organismos deterioradores (ANGAJALA *et al.*, 2016; JOHNSON-GREEN *et al.*, 2002).

Outras aplicações das enzimas são como biocatalisadores nos processos de produção de biodiesel. Os biocatalisadores como as lipases vêm demonstrando uma tecnologia produtiva e promissora, pois além de reduzir consideravelmente os custos de produção, o processo terá uma base biológica e renovável (BOTTON *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2017; HAJAR & VAHABZADEH, 2016; MADALOZZO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2012; OHE 2011; FERNANDES *et al.*, 2007; BARON *et al.*, 2005).

As hidrolases são uma classe especial de enzimas que demonstram uma ampla especificidade com relação ao substrato. Elas são capazes de hidrolisar peptídeos, haletos, amidas, bem como ésteres e triglicérides (FOJAN *et al.*, 2000).

Atualmente, as hidrolases são uma das classes de enzimas mais utilizadas em biotecnologia (GURUNG *et al.*, 2013), como por exemplo, as carboidrases, proteases e lipases. Estas hidrolases superam mais de 70% de todas as vendas de enzimas no mercado mundial, que deve chegar a US \$ 10,7 bilhões até 2024 (GLOBAL MARKET INSIGHTS 2016; LI *et al.*, 2012).

As enzimas hidrolíticas compõem uma grande classe de enzimas responsáveis pela catálise das reações de hidrólise de diversos substratos, tais como: proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídios, além de biomoléculas menores como aminoácidos, ésteres e fosfatos orgânicos. Uma grande variedade de enzimas hidrolíticas pode ser produzida pelos fungos filamentosos e tem sido muito explorada tecnologicamente, com aplicação em vários setores industriais (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Dentre as enzimas hidrolíticas, podemos citar as lipases (glicerol ester hidrolase E.C. 3.1.1.3), que são biocatalisadores versáteis capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito (RODRIGUES *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2007; BARON *et al.*, 2005).

2.2.1. Lipases

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas cuja sua principal função é a catalisar a hidrólise de triacilgliceróis insolúveis, em ácidos graxos livres, mono, diacilgliceróis e glicerol. Além de sua função natural, as lipases podem catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não aquosos. As

lipases constituem uma classe especial de carboxil éster hidrolases. Já as esterases são enzimas que hidrolisam triacilgliceróis de cadeia curta (menor que de 10 átomos de carbono) (DOS SANTOS *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016; MESSIAS *et al.*, 2011.; RIGO, 2010).

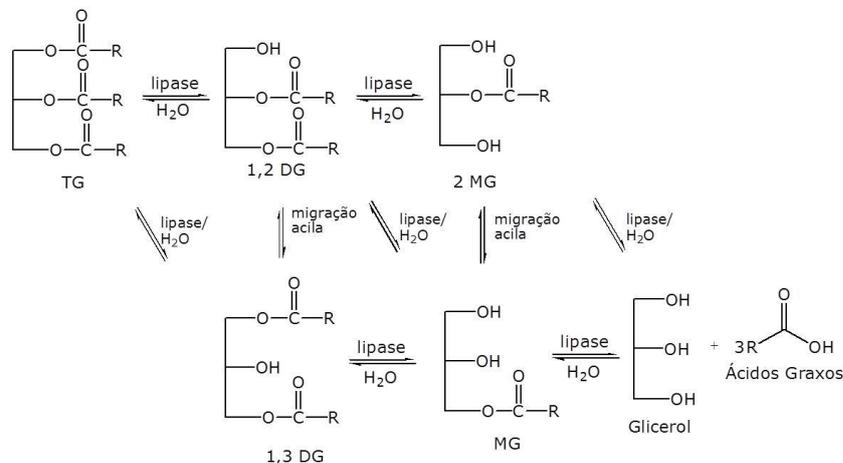


Figura 5 Reações de hidrólise de um triacilglicerol catalisadas por lipase. Fonte: FUREBY *et al.*, 1997.

As lipases e as esterases catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres. São enzimas versáteis que podem suportar processos industriais, pois são estáveis em amplas faixas de pH, elevadas temperaturas (enzimas termoestáveis) e a presença de solventes orgânicos (GUPTA *et al.*, 2004). Elas também exibem características de quimio, estereo e regioseletividade que são de interesse em aplicações, como a síntese de compostos opticamente puros (HAKI & RAKSHIT, 2003). Sua flexibilidade catalítica, robustez e alta especificidade atraem muita atenção como biocatalizadores industriais.

2.2.1.1. Fontes de lipases

As lipases são podem ser obtidas a partir de microrganismos naturais ou geneticamente modificadas e também a partir de fontes animais e vegetais. A principal forma de produção de lipases tem sido através de culturas de microrganismos, pois estes processos apresentam maior facilidade de controle, maior capacidade produtiva e custo reduzido de obtenção (BABICZ, 2009).

Um grande número de fungos filamentosos tem sido estudado para a produção de lipases, sendo eles uma das mais importantes fontes de lipases para aplicações industriais, pois as enzimas produzidas são extracelulares facilitando a extração do meio de cultivo (SILVA *et al.*, 2005). São inúmeras as lipases fúngicas existentes, porém as mais estudadas

são os fungos do gênero *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Penicillium* (CARVALHO *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2001).

A lipase pode ser utilizada para acelerar a degradação de resíduos graxos, sendo que a maioria das lipases microbianas industriais é produzida por fungos e de bactérias (SHARMA, CHISTI & BANERJEE, 2001).

A produção de lipase pode ser desenvolvida por dois métodos, por fermentação submersa (FS) ou por fermentação em estado sólido (FES). Em sistemas de FES o microrganismo cresce entre as partículas de um substrato orgânico sólido, com um mínimo de água livre nos espaços entre as partículas de substrato. Assim, o substrato fermentado atua como suporte para a enzima, sem a necessidade de uma etapa de extração prévia e imobilização do biocatalisador (KURGER, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2015; FERNANDES, 2007).

A FES é uma tecnologia de alto rendimento para a produção de enzimas, pois esse processo pode ser realizado em “*in situ*” e rejeitos industriais podem ser empregados como fonte de nutrientes para o processo fermentativo. Na Fermentação em estado sólido obtêm-se maiores rendimentos de produção de lipases, quando comparada com a fermentação submersa; esta vantagem é atribuída à alta taxa de crescimento da biomassa e à baixa atividade proteolítica (MARTINS, 2008). A FS é uma técnica bastante utilizada nos países ocidentais para a produção de enzimas devido à facilidade de crescimento dos microrganismos em condições controladas de pH e temperatura, além de facilitar a recuperação das enzimas extracelulares (ORLANDELLI, 2012).

2.2.1.2. Aplicações industriais das lipases

As enzimas são utilizadas atualmente para uma variedade de aplicações industriais. O mercado industrial de enzimas continua crescendo devido à implantação de novas tecnologias de produção, ao uso da engenharia genética na produção e ao surgimento de novos campos de aplicação. Na indústria, as lipases microbianas têm um grande destaque devido sua versatilidade e simplicidade na manipulação genética, resultando no menor custo na produção.

A Tabela 1 apresenta as principais aplicações industriais das lipases.

As lipases são utilizadas nas indústrias alimentícias, detergentes, medicamentos e tratamento de efluentes (LAGE *et al.*, 2016; RAMNATH, SITHOLE & GOVINDEN, 2016; COLLA *et al.*, 2012; SINGH & MUKHOPADHYAY, 2012).

No entanto, a capacidade hidrolítica das lipases vem sendo estudada em outros campos de aplicações, como na indústria de couro; em processos de biodegradação e tratamento de águas residuárias (efluentes) ricas em gorduras, provenientes de fábricas, frigoríficos, laticínios, ou de indústrias de refinação de óleos e gorduras, que poluem solos e águas; e na indústria de papel e celulose, para remoção de material hidrofóbico como as ceras que são indesejáveis na manufatura de papel (KRUGER, 2017; ANGAJALA *et al.*, 2016; RAMNATH, SITHOLE & GOVINDEN, 2016).

Na indústria alimentícia, as lipases são utilizadas para modificar as propriedades organolépticas do alimento, como textura e sabor; na produção de flavorizantes, aromatizantes e na maturação do queijo; e na modificação de óleos vegetais na posição 2 do triacilglicerol (PANDEY *et al.*, 2013; COLLA *et al.*, 2012).

Tabela 2 Aplicações industriais das lipases.

Setor	Aplicações das lipases	Produto
Alimentos		
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Formação do aroma para produtos lácteos
Panificação	Melhora sabor e qualidade, prolongamento da vida útil do alimento	Confeitos e bolos
Bebidas	Melhora aroma e aumenta a velocidade da fermentação, por remoção de lipídios	Bebidas alcoólicas como o saquê, vinho e outras
Processamento de derivados do ovo, carnes e peixes	Melhora a qualidade do ovo por hidrólise dos lipídios, desenvolvimento do aroma e remoção de gordura	Maionese, produtos embutidos.
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais, hidrólise de óleos	Óleos e gorduras modificadas
Químico		
Química fina	Síntese de Ésteres	Ésteres
Detergentes	Retirada de manchas de gorduras de alimentos	Detergentes
Farmacêutico e Médico		
Medicina	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivo
Cosmético Analítico	Remoção de Lipídios Análise de triglicerídeos no sangue	Cosméticos em geral Diagnóstico

Fonte: SALIHU & ALAM, 2015; SILVA, 2007; CASTRO *et al.*, 2004.

2.3. BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é uma tecnologia que utiliza microrganismos, plantas e enzimas para decompor ou modificar poluentes do ambiente. Geralmente, os microrganismos utilizados são fungos, bactérias e leveduras, sendo uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados. Entre os microrganismos envolvidos neste processo estão presentes representantes dos eucariotos e procariotos de vários gêneros. Atualmente há uma grande preocupação em desenvolver biotecnologias para descontaminar ambientes poluídos com

moléculas orgânicas de difícil degradação e metais tóxicos (ANDRADE *et al.*, 2010; GAYLARD, BELLINASSO & MANFIO, 2005).

A biorremediação tem como objetivo o tratamento de áreas contaminadas utilizando a capacidade intrínseca dos microrganismos de degradar matérias orgânicas tóxicas, tanto de origem natural como compostos sintéticos. O processo de biorremediação varia de acordo com o tipo de tratamento podendo ser classificada como “*ex situ*” ou “*in situ*”. No tratamento “*ex situ*”, o material contaminado é retirado do seu local e é tratado em outro local. Na técnica “*in situ*”, o tratamento é realizado no próprio local contaminado (SILVA & RONDON, 2013; COELHO, 2005).

A técnica “*in situ*” apresenta vantagens em relação à “*ex situ*”, como o menor custo e degradação ambiental, pois não há remoção do material contaminado para outro lugar destinado para o tratamento. Os produtos finais de uma biorremediação eficaz são o gás carbônico e água, que não apresentam toxicidade para os organismos vivos. Entre as técnicas mais utilizadas nos processos “*in situ*” na biorremediação encontram-se a intrínseca (ou passiva), bioestimulação, bioaumentação, air sparging e bioventilação (LIMA, 2010).

2.3.1. Intrínseca

A biorremediação passiva ou intrínseca é uma técnica “*in situ*”, na qual o contaminante permanece no local e, por meio de processos naturais, como biodegradação (mecanismo natural de atenuação de contaminantes no ambiente); volatilização (quebra da molécula em compostos voláteis); diluição (diminuição da concentração inicial do poluente) e sorção (adsorção do poluentes a parede celular microbiana ou a seus metabólitos) ocorrem a descontaminação do ambiente (PEREIRA *et al.*, 2012).

A biorremediação passiva pode ser muito lenta, pois ela depende exclusivamente de processos naturais, exige também o uso conjunto de outras técnicas e, obrigatoriamente, o monitoramento do local por longos períodos de tempo, visando à proteção da saúde do homem e do ambiente (JACQUES *et al.*, 2007).

2.3.2. Bioestimulação

È uma técnica que visa aumentar a atividade microbiana da população nativa pela adição de nutrientes como fósforo (P) e nitrogênio (N) e/ uso de estimulantes aumentando a disponibilidade do contaminante. Esta técnica pode promover alterações ambientais do solo como corrigir a umidade, o pH, e a aerações do solo obtendo melhores remoções dos poluentes (TOMASSONI *et al.*, 2014).

2.3.3. Bioaugmentação

Esta técnica pode ser utilizada tanto *in situ* quanto “*ex situ*”. Ela consiste na adição de microrganismos específicos em regiões impactadas, sendo adequadas às condições do ambiente em laboratório. Garantindo dessa forma que o consórcio adequado de microrganismos estará presente em tipo, número e compatibilidade suficientes, a fim de metabolizar o poluente de forma eficaz (MORAIS FILHO & CORIOLANO, 2016).

2.3.4. Air sparging

O Air Sparging é um meio de remoção e destruição do contaminante “*in situ*”. O sistema de aeração “*in situ*” pode, também, favorecer a biodegradação aeróbica de determinados compostos por aumentar a quantidade de oxigênio dissolvido nas águas. Consiste na injeção de ar na zona saturada do solo, permitindo a transferência da fase dissolvida dos hidrocarbonetos voláteis para a fase de vapor. Por outro lado, a injeção de ar também promove a biodegradação dos contaminates durante a migração dos voláteis da zona saturada para a zona não saturada do solo. Esta tecnologia é geralmente combinada com a de extração à vapor, tal como anteriormente referido, para extrair a fase de vapor que se encontra na zona não saturada do solo e que não foi biodegradada (SILVA 2008).

Os fatores que podem limitar a aplicabilidade e eficiência do processo são: profundidade da contaminação e do nível d'água local; tipos litológicos pouco permeáveis, que impossibilitam a subida dos gases; a injeção de ar deve ser projetada para condições específicas e o fluxo de ar através da zona não saturada pode não ser uniforme, reduzindo a performance da técnica. Esta tecnologia opera com altas taxas de fluxo de ar, a fim de se manter contato constante entre a água e o solo e propiciar maior aeração da água subterrânea (COUTINHO *et al.*, 2007)

2.3.5. Bioventilação

È uma técnica que consiste na adição de oxigênio no solo contaminado, estimulando o crescimento dos organismos naturais e/ou introduzidos, sendo uma técnica eficiente quando se trata de contaminantes degradáveis em meio aeróbio, porém deve manter condições favoráveis como: a manutenção do pH, a temperatura e o fornecimento de nutrientes (CARNEIRO & GARIGLIO, 2010).

2.4. PARÂMETROS DA QUALIDADE DA ÁGUA

O globo terrestre é composto por grande parte de água, a mesma cobre aproximadamente 70% da sua superfície, líquido que se torna um dos recursos mais abundantes do planeta devido a sua distribuição, porém apenas uma pequena parcela de toda a água existente é doce, que é a utilizada para o consumo humano, ainda necessitando da sua adequação as características físicas, químicas e biológicas. E em consequência do aumento econômico, populacional, e a sua distribuição geográfica, aceleram o processo de degradação dos recursos hídricos (SIQUEIRA, 2011)

A portaria 2914 (Brasil, 2011) traz algumas definições importantes para o entendimento do estudo, sendo três, muito importantes: padrão de potabilidade, água potável e água para consumo humano. O padrão segundo a portaria são parâmetros com valores definido pela mesma para uma boa qualidade da água, a água potável é um aflente que atenda a todos aos parâmetros contidos na portaria e que não ofereça riscos com a sua ingestão e a água para consumo humano é aquela destinada a ingestão, higiene pessoal, preparo e produção de alimentos.

Segundo um informe técnico do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) (2009), existem doenças causadas pelos contaminantes presentes nas águas, são doenças relacionadas à transmissão hídricas, ou seja, são causadas pela ingestão de água não tratada, podendo ser de minas, poços, bicas ou de água mineral que tenha a fonte contaminada. As principais doenças causadas pela ingestão da água contaminada são a cólera, febre tifóide, hepatite A, além de doenças diarréicas, provocadas por bactérias como *Escherichia Coli* e *Shigella*.

A poluição é definida pela Lei n. 6938/81, art. 3º, III, como resultado de atividades que direta ou indiretamente prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população,

criem condições adversas às atividades sociais e econômicas, afetem desfavoravelmente a biota, afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente, lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos.

Faustino (2011) diz que 90% do esgoto produzido dentro do território brasileiro, é despejado em rios, lagos e mares, sem nenhum tratamento prévio. Além do grande problema das faltas de políticas brasileiras voltadas para o saneamento básico, também temos grandes problemas com a distribuição do saneamento. Ainda de acordo com a autora, para cada mil litros de água que são utilizados, cerca de outros 10 mil são poluídos.

Então de acordo com Richter e Neto (2005) um dos erros mais comuns ao se analisar uma água, é considerar o resultado, baseado em apenas uma única análise da água, pois, a qualidade tende a variar com o tempo e com o local analisado, deve-se então praticar análises periódicas a fim de garantir um resultado satisfatório, pois a sua repetição, tende a amenizar a variação dos resultados.

2.4.1. Parâmetros físicos

A característica física está relacionada aos sólidos presentes na água, vista de uma maneira geral, como não sendo um parâmetro muito importante, pois os parâmetros atrelados a essa característica são muitas vezes relacionados à estética da água, os parâmetros são: cor, turbidez, sabor e odor. (TELLES & COSTA, 2010).

De acordo com Richter e Netto (2005) as características físicas não demonstram tanto importância em aspecto sanitário, e apresentam uma facilidade em se determinar os parâmetros. As características químicas é de extrema importância para o ponto de vista sanitário, são identificadas através de análises e os seus resultados são expressos geralmente substância mg L⁻¹. As características biológicas são importantes no abastecimento, pois muitos microrganismos quando presentes no corpo hídrico causam transmissões de doenças.

2.4.1.1. Cor

Para Von Sperling (2005) a cor é uma representação da coloração presente na água, causada naturalmente pela decomposição de matérias orgânicas, e antropogenicamente pelos resíduos industriais e de esgotos domésticos, assim como o sabor e o odor.

A coloração não representa um risco à saúde, porém a confiabilidade do consumidor da água, ainda afirma que existe uma grande diferenciação entre cor aparente e cor verdadeira, sendo que a aparente está ligada parcialmente a turbidez, que quando a mesma é removida, obtém-se a cor verdadeira. Segundo Richter e Netto (2005), a água é ausente de cor, sendo que a alteração da cor da mesma se dá pelo material que se encontra dissolvido e pela quantidade do mesmo.

O pH é extremamente ligado a cor, quanto menor for o pH, ou seja, mais ácido, mas fácil é a remoção da cor, porém quanto maior for, mais intensa será a cor.

2.4.1.2. Turbidez

A turbidez é uma característica da água devido à presença de materiais sólidos em suspensão, que reduzem a sua transparência. Pode ser provocada também pela presença de algas, plâncton, matéria orgânica e muitas outras substâncias como o zinco, ferro, manganês e areia, resultantes do processo natural de erosão ou de despejos domésticos e industriais (NOVICKI & CAMPOS 2016).

A turbidez tem sua importância no processo de tratamento da água. Água com turbidez elevada e dependendo de sua natureza, forma flocos pesados que decantam mais rapidamente do que água com baixa turbidez. Também tem suas desvantagens como no caso da desinfecção, que pode ser dificultada pela proteção que pode dar aos microrganismos no contato direto com os desinfetantes. É um indicador sanitário e padrão de aceitação da água de consumo (PALUDO, 2010).

2.4.1.3. Sabor e odor

Para Richter e Netto (2005), o sabor e o odor são muito difíceis de serem avaliados. Eles estão associados a sensações e, por isso estão alocadas ao mesmo parâmetro, pois geralmente o sabor é originado do odor que exala. O autor ainda confirma que esse parâmetro sofre variação em relação às impurezas que estão dissolvidas no corpo hídrico, geralmente de natureza orgânica. Os autores sugerem que a aeração pode ser eficaz, em outros casos é necessário à utilização de carvão ativado para adsorver os compostos causadores de odor.

Von Sperling (2005) reafirma que é uma interação associada entre sabor e odor que são alterados por fatores naturais, quanto antropogênicos. Estes parâmetros físicos não são muito importantes, pois não representa riscos à saúde.

2.4.1.4. Sólidos

De acordo com Von Sperling (2005), os sólidos que estão presentes nas águas são gerados em boa parte pelos contaminantes, sendo que se exclui os gases dissolvidos. Eles podem ser separados pelas características físicas pelo seu tamanho e estado, ou pela característica química.

A sua classificação de acordo com a característica física é: sólidos em suspensão (SS), sólidos coloidais (SC), sólidos dissolvidos (SD). Sendo o (SS) responsável pela turbidez e o (SD) responsável pelo estado da Cor da água.

As características químicas são representadas por dois tipos de matérias, sendo as orgânicas e as inorgânicas, onde os sólidos submetidos a altas temperaturas (55 °C) terão os sólidos orgânicos volatilizados e os inorgânicos não. A resolução do CONAMA 300/2011 indica um limite de 500 mg L⁻¹ de sólidos dissolvidos totais e a portaria do Ministério da Saúde 2914/11 um valor máximo permitido de 1000 mg L⁻¹.

2.4.2. Parâmetros químicos

As características químicas são referentes às substâncias que se encontram dissolvidas na água e que causam alterações nos parâmetros: potencial hidrogeniônico (pH); alcalinidade; acidez; dureza; ferro; manganês; cloretos; nitrogênio; fósforo; oxigênio dissolvido; matérias orgânicas; metais pesados e também micropoluentes. Considerado uma das características mais importantes, a presença de micropoluentes na água pode ter consequências indesejáveis sobre o ecossistema e o afluente (TELLES & COSTA, 2010).

2.4.2.1. Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH é definido como o co-logaritmo da atividade do íon hidrogênio (- log [H⁺]). A acidez ou a alcalinidade de uma solução é indicada pelo valor do pH, sendo o pH = 7,0 uma

solução neutra; pH < 7,0 uma solução ácida e pH >7,0 uma solução alcalina (VON SPERLING, 2005).

A determinação do pH baseia-se na atividade dos íons hidrogênio por meio da medida potenciométrica utilizando-se um eletrodo de vidro e um de referência ou um eletrodo de vidro combinado (ZENEBOON *et.al.*, 2008).

2.4.2.2. Dureza

Para Richter e Netto (2005) a dureza da água é devido à presença de íons metálicos, sendo cálcio, magnésio, ferros e do estrôncio. A característica da dureza é a capacidade de impedir que haja formação de espumas. O autor ainda destaca que ela é representada por carbonato de cálcio (CaCO₃) podendo ser classificadas de duas maneiras, pelos íons metálicos e pelos ânions associados com os íons metálicos.

A Tabela 3 apresenta a classificação da água de acordo com o grau de dureza.

Tabela 3 Nomenclatura aferida ao grau de dureza

Nomenclatura	Quantidade
Moles	Dureza inferior a 50 mg L ⁻¹ em CaCO ₃
Dureza Moderada	Dureza entre 50 a 150 mg L ⁻¹
Duras	Dureza entre 150 a 300 mg L ⁻¹ em CaCO ₃
Muito duras	Dureza superior a 300 mg L ⁻¹ em CaCO ₃

Fonte: Richter e Netto (2005).

Ainda de acordo com os autores Richter e Netto (2005), a água dura, não representa um risco a saúde.

De acordo com Telles e Costa (2010), a dureza é associada a presença de sais alcalinos terrosos que estão dissolvidos nas águas. Para Von Sperling (2005) as áreas que apresentam águas com um grau maior de dureza, apresentam menores incidências de doenças cardiovasculares.

2.4.2.3. Ferro e manganês

Para Von Sperling (2005), o ferro (Fe) e o manganês (Mn) presentes em uma grande quantidade de solos encontram-se de forma solúveis (Fe^{3+} e Mn^{4+}). Caso haja ausência de oxigênio dissolvido na água eles passam para uma forma reduzida (Fe^{2+} e Mn^{2+}). Caso haja presença dessa forma reduzida na água e ela seja exposta ao atmosférico, o Fe e o Mn sofrem oxidação e voltam a sua forma solúvel, causando manchas em roupas e coloração na água.

De acordo com Richter e Netto (2005) as associações do Fe com o Mn podem causar muitas vezes uma alteração ao sabor, conferindo um sabor amargo à água, coloração amarelada e aumentando a turbidez da água. Isso ocorre em decorrência da precipitação do mesmo, sendo muito prejudicial para empreendimentos como lavanderias e indústrias de bebidas gaseificadas.

Segundo Telles e Costa (2010) o fósforo existe em duas formas, sendo elas as orgânicas e as inorgânicas. Para Von Sperling (2005) ele apresenta várias formas na água, sendo: fosfato, polifosfato e fósforo orgânico. Não apresenta uma grande importância em relação ao abastecimento, porém por ser um elemento indispensável para o desenvolvimento de algas, pode ocorrer uma proliferação demasiada dessas algas, ocasionando o problema de eutrofização no corpo hídrico.

2.4.2.4. Nitrogênio

De acordo com Von Sperling (2005), o ciclo de nitrogênio dentro da biosfera, alterna-se entre várias formas e oxidações. Nos corpos hídricos pode ser encontrado em várias formas, como: nitrogênio molecular (N_2), nitrogênio orgânico, amônia (NH_3 em estado livre e NH_4^+ quando ionizada), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-).

A presença de NH_3 , NO_2^- e NO_3^- indica a poluição. São originados por fatores naturais como parte da composição celular de microrganismos, ou a partir das proteínas ou compostos biológicos, causado de forma antrópica com o despejo incorreto de resíduos domésticos e industriais e também por fertilizantes utilizados na agricultura.

Para Richter e Netto (2005) a presença de nitrogênio no corpo hídrico pode indicar duas situações de uma poluição por descarte de esgoto próxima, caso contenha presença de

nitrogênio orgânico e amônia, ou longe caso haja nitrato. Segundo o autor, isso ocorre porque o nitrato é a última etapa da oxidação do nitrogênio.

2.4.2.5. Oxigênio Dissolvido

Para Richter e Netto (2005) determinar o teor de oxigênio dissolvido (OD) é um dos fatores mais importantes no controle de qualidade da água e Bárbara (2006) afirma que “o oxigênio dissolvido é um dos constituintes mais importantes no meio aquático”. Ainda de acordo com Bárbara (2006) pode-se dizer que o oxigênio dissolvido apresenta ser um ótimo indicador da capacidade que o leito hídrico tem em fazer o processo de autodepuração das cargas de substâncias que ele recebe. Alguns fatores influenciam na quantidade de OD que estão presentes nos corpos hídricos, sendo ela a temperatura, a pressão atmosférica, altitude e a salinidade.

2.4.2.6. Demanda bioquímica de oxigênio (DBO)

Segundo Bárbara (2006) a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) é uma determinação do oxigênio dissolvido que é consumido pelos microrganismos para que se possa ser feito o processo de oxidação da matéria orgânica biodegradável. Ainda diz que a DBO, sempre será de maneira inversa a quantidade de oxigênio dissolvido que está presente no ecossistema. Telles e Costa (2010) complementam que a DBO é um processo medido em 5 dias, em uma incubação a 20°C. É a medição do oxigênio utilizado pelos microrganismos durante esses cinco dias para estabilização bioquímica dos materiais orgânicos.

2.4.2.7. Demanda bioquímica de oxigênio (DQO)

Demanda química de oxigênio (DQO) é um indicador de matéria orgânica baseado na concentração de oxigênio consumido para oxidar a matéria orgânica, biodegradável ou não, em meio ácido e condições energéticas por ação de um agente químico oxidante forte (VALENTE, 1997).

A DQO é importante na quantificação da matéria orgânica em despejos, sendo sempre maior ou igual à DBO, em virtude da maior facilidade com que grande número de compostos podem ser oxidados quimicamente do que por microrganismos (PARRON, 2011).

2.4.2.8. Óleos e graxas

São gorduras, ésteres, geralmente oriundos de resíduos industriais, efluentes de oficinas mecânicas entre outros. O despejo incorreto contribui para o aumento de matérias graxas nos corpos d'água. A presença de óleos e graxas diminui a área de contato entre a superfície da água e o ar atmosférico, impedindo a transferência do oxigênio da atmosfera para a água. A presença de óleos e graxas reduz o oxigênio dissolvido e eleva a BDO e a DQO causando alteração do ecossistema aquático (TAVARES, 2009).

A análise de teor de óleos e graxas (TOG) é de suma importância para o parâmetro de qualidade da água sendo utilizadas para ter o controle dos descartes de óleos e graxas nas águas. É um parâmetro requerido pela legislação e um componente importante no controle dos processos industriais.

A Resolução CONAMA 430/2011. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedeçam às seguintes condições para óleos e graxas: óleos minerais até 20 mg L⁻¹; óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg L⁻¹.

2.4.2.9. Toxicidade

O teste de toxicidade é realizado em condições específicas. Este teste é utilizado para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais como uma ferramenta importante para avaliar a qualidade das águas e a carga poluidora de efluentes.

As análises físico-químicas tradicionalmente realizadas, como a demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos suspensos, concentrações de metais e de outras substâncias de caráter orgânico ou inorgânico, cujos limites encontram-se estabelecidos nas legislações ambientais. (COSTA *et al.*, 2008)

3. JUSTIFICATIVA PARA A ESCOLHA DO MICRORGANISMO

A linhagem fúngica de *Penicillium sumatrense*, empregada nesse estudo foi isolada das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*) e identificada por sequenciamento de DNA ribossomal, de acordo com a metodologia descrita por Stringari (2009). Esta é uma enzima

nova, produzida por uma linhagem selvagem isolada das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*). Poucos trabalhos foram encontrados na literatura utilizando-se o fungo *Penicillium sumatrense* isolado das folhas de mamona (OLIVEIRA, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2015).

A escolha por este microrganismo foi devida a algumas características importantes apresentadas pela lipase por ele produzida. Estudos prévios (Oliveira, 2013) demonstraram que a produção de lipases foi de 3183 U (31,83 U gSS⁻¹) em 100 g de substrato (girassol), frente ao método titulométrico. A atividade lipolítica produzida no meio de fermentação é alta quando comparada com a produzida por outros microrganismos selvagens (*Penicillium aurantiogriseum* 13 U mL⁻¹ em 72 h e *Penicillium corylophilum* 7 U mL⁻¹ em 120 h (LIMA *et al.*, 2003; BARON, 2003).

Em estudos prévios, realizados pelo nosso grupo de pesquisa verificou-se que a atividade da lipase produzida pelo fungo *Penicillium sumatrense* isolado das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*) foi elevada. Nos estudos utilizando-se o crambe (*Crambe abyssinica hochst*) como substrato a atividade foi de 243 U (24,3 U gSS⁻¹) (KRÜGER, 2017) e com o girassol utilizado neste trabalho foi de 678 U (67,8 U gSS⁻¹), todos em 10 g de substrato.

Estes resultados justificam a continuidade dos estudos da lipase de *Penicillium sumatrense* visando avaliar o uso dos processos de biorremediação de efluentes com alto teor de gordura, como os das indústrias de produção de biodiesel, para potencializar ainda mais os resultados já obtidos.

Outro aspecto importante e que justifica este trabalho é que esta pesquisa é inédita. Não foram encontrados artigos científicos e patentes relacionados ao tema relacionado nesta pesquisa.

A produção de enzimas por FES e a aplicação direta dos biocatalisadores produzidos na biorremediação de efluentes com alto teor de gordura, justificam plenamente este trabalho, considerando o aumento dos volumes de resíduos agroindustriais e efluentes gerados nas indústrias, associado à crescente preocupação com os impactos ambientais destes e uma legislação ambiental cada vez mais rígida.

3. OBJETIVOS

Avaliar a biodegradação de óleos e graxas em efluentes de água residuária de lavagem do biodiesel, por meio de lipase fúngica de *Penicillium sumatrense* obtida através do processo de FES (Fermentação em Estado Sólido).

Objetivos Específicos

- Caracterizar as águas da lavagem do biodiesel antes e após a biorremediação em relação a: pH, turbidez, toxicidade, demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e óleos e graxas;
- Avaliar a eficiência do tratamento através da biorremediação;
- Avaliar a capacidade da lipase produzida pelo fungo *Penicillium sumatrense* em biodegradar contaminantes;
- Avaliar a qualidade da água de lavagem para fins de lançamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, no Centro de Engenharia e Ciências Exatas- Campus Toledo se utilizando dos Laboratórios de Microbiologia e Laboratório de Processos de Separação.

4.1. REAGENTES

Foram utilizados reagentes de grau analítico como n-heptano (Neon, 99 % de pureza), tolueno (Sigma- Aldrich, 99,7 % de pureza).

4.2. MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma cepa fúngica endofítica isolada das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*), identificada como *Penicillium sumatrense*.

O fungo endofítico *Penicillium sumatrense* já está identificado por sequenciamento de DNA ribossomal, de acordo com metodologia descrita por STRINGARI (2009).

4.3. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS

Para garantir condições estéreis de crescimento dos micro-organismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

4.4. ESTOQUE E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS

Para a manutenção, realizada a cada quatro meses, o fungo *Penicillium sumatrense*, foi incubado em meio BDA – cloridrato de tetraciclina (250 mg L⁻¹ de meio BDA) em tubos inclinados e placas de Petri. O fungo foi incubado em estufa a 27°C por quatorze dias. Após o crescimento, o fungo foi transferido e estocado em tubos estéreis contendo água estéril (CASTELANI, 1967). A cepa foi então armazenada, sob refrigeração, a 4°C.

4.5. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS

A composição centesimal das sementes de girassol, como umidade, cinzas e teor de óleo foi determinada nos Laboratórios de Microbiologia e Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

4.5.1. Determinação do teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método descrito conforme Zenebon *et. al* (2008). As amostras foram trituradas até a formação de um pó fino. Em seguida, suas massas (aproximadamente 1 g) foram acrescentadas em cadinhos, tratados em mufla a 650°C pesados anteriormente, utilizando balança analítica. Então foi colocado em uma estufa à temperatura de 110°C por 1 hora. Colocou-se em um dessecador até atingir a temperatura ambiente, posteriormente, submetidas à nova pesagem até a obtenção do peso constante. Essas medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra.

4.5.2. Determinação do teor de Cinzas

A determinação quantitativa das cinzas totais foi realizada também de acordo com o método descrito por Zenebon *et. al* (2008). Para isso, foram pesados aproximadamente 1 g do substrato, transferido para cadinhos de porcelana previamente calcinados, arrefecidos e pesados. Após a distribuição uniforme das amostras nos cadinhos, as mesmas foram incineradas na temperatura de 700°C por 3 horas. Após esta etapa foram calculadas as percentagens de cinzas em relação ao substrato que foi submetido ao processo de secagem. Essas medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra.

4.5.3. Determinação do teor de Óleo

Para a determinação do teor de óleo foi utilizado o extrator de Soxhlet, onde a amostra foi pesada em balança analítica e transferida para um cartucho tampado com algodão. O cartucho foi colocado em um extrator, encaixado em um balão volumétrico. Sobre o cartucho, foi vertido o solvente, responsável pela extração dos óleos. O condensador foi conectado e a manta de aquecimento ligada. O tempo de extração foi de 6 horas após o início da ebulição.

Após a amostra foi secada com a evaporação do solvente e novamente pesada (ZENEBAON *et. al.*, 2008).

4.6. PRODUÇÃO DA LIPASE

Para a produção da enzima, foi utilizado como substrato, o farelo de semente de girassol (FSG), sem adição de indutores.

Foram determinadas as melhores condições de crescimento e de produção da enzima previamente pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Maria Luiza. Foram estudadas as seguintes variáveis: (1) granulometria do substrato; (2) umidade do substrato; (3) tempo do cultivo. Nestes estudos, as fermentações foram analisadas em termos de produção de atividade lipolítica, medida usando o método titulométrico (item 4.9.1) e expressa como Unidades por grama de sólido fermentado ($U\ gss^{-1}$).

4.6.1. Preparação dos Substratos

Nestes estudos utilizou-se um substrato com alto teor lipídico, o farelo de semente de girassol (*Helianthus annuus*), adquirido em uma Agropecuária de Toledo, Paraná. Este substrato foi previamente seco a 55-60 °C em estufa por 24 horas. Depois de secos, os substratos foram moídos, tamisados e embalados em sacos plásticos, sendo utilizadas as frações do farelo de semente de girassol com granulometria entre 1,19 mm (16 Mesh) e 2,0 mm (10 Mesh) de diâmetro para os estudos de FES, segundo KRUGER (2017) e FERNANDES (2007).

4.6.2. Condições de Cultivo no Meio Sólido

Para avaliar a produção da enzima, utilizou-se como substrato o farelo de semente de girassol (FSG).

Os ensaios de FES foram realizados conforme metodologia descrita por Fernandes (2007). Para a preparação do inóculo foram utilizados frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo o meio BDA – cloridrato de tetraciclina ($250\ mg\ L^{-1}$ de meio BDA). O fungo foi incubado em estufa a 27°C por sete dias. Após o crescimento foi feita a maceração do meio através de pedras de porcelana e adição água estéril no material e solubilizado.

Para a FES foram utilizados Erlenmeyers de 1000 mL, contendo, 75 g de substrato FSG, com granulometrias de 10 e 16 Mesh e teores de umidade de 60 %, utilizando-se tampão fosfato pH 7,0 (50 mM). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após o preparo, os substratos foram inoculados assepticamente com o inóculo (10^8 esporos g^{-1} de substrato seco), variando-se a quantidade final no meio sólido. Em seguida, os sólidos foram incubados em estufa a $27^{\circ}C$ durante 24, 48, 72, 96 e 120, 144 e 168 horas. A produção de lipase foi acompanhada pela dosagem da atividade lipolítica (método titulométrico) no material fermentado. A atividade lipolítica é expressa como unidades de atividade enzimática por grama de sólido fermentado ($U\ gss^{-1}$).

4.6.3. Secagem do Sólido Fermentado

Os sólidos fermentados foram congelados a $0^{\circ}C$ por 24 horas para interromper o crescimento fúngico. Após esse período, foram secos em estufa em circulação de ar por 48 horas à $30^{\circ}C$, acondicionados em embalagens plásticas e armazenados em geladeira.

4.7. EFLUENTE

O efluente utilizado neste estudo foi cedido por uma Indústria de biodiesel na região Noroeste do Paraná. Os principais produtos desta empresa são biodiesel, farelo de soja, grãos, borra e glicerina.

4.7.1. Caracterização do Efluente

Para a caracterização do efluente foram realizadas análises físico-químicas iniciais do efluente gerado pela lavagem do biodiesel, quanto aos parâmetros de demanda química de oxigênio (DQO); demanda bioquímica de oxigênio (DBO); sólidos totais (ST); turbidez; pH; cor; determinação de óleos e graxas (Tabela 4).

Tabela 4 – Variáveis estudadas com os métodos de análise e a metodologia utilizada.

PARÂMETRO	UNIDADES	MÉTODO	PROTOCOLO APHA 2012	OUTRA METODOLOGIA
DQO	mg O ₂ L ⁻¹	Colorimétrico	5220 B	
DBO	mg O ₂ L ⁻¹	Colorimétrico	5210 B	
ST	mg L ⁻¹	Gravimétrico	2540 D	
O&G	mg L ⁻¹	Gravimétrico por Centrifugação	-	SUEHARA <i>et al.</i> , 2005.
TURBIDEZ	UNT	Nefelométrico	2130 B	
pH	-	Potenciométrico	4500-H B	

4.8. BIORREMEDIAÇÃO

Os estudos de biorremediação foram utilizados o sólido fermentado contendo a lipase por adição direta.

4.8.1. Adição Direta do Material Fermentado

Nestes experimentos, a enzima foi produzida por FES com o farelo de semente de girassol (*Helianthus annuus*) utilizando granulometria entre 10 Mesh (2 mm) e 16 Mesh (1,19 mm) e umidade de 60%.

4.8.1.1. Ensaio utilizando a enzima produzida com o FSG

O processo de biorremediação foi realizado em triplicata utilizando-se erlenmeyers de 250 mL, 10,0 g de sólido fermentado com atividade de 67,86 U gss⁻¹ (678,6 U) para 100 mL do efluente. As amostras contendo a enzima foram deixadas no shaker, sob agitação de 150 rpm a 37°C no período de 30 dias, sendo retiradas amostras a cada 7 dias para análises. O objetivo desta etapa é verificar qual o tempo necessário de biorremediação para a redução de óleos e graxas.

4.8.1.2. Determinação da razão de biodegradabilidade do efluente (DBO₅/DQO)

A razão de biodegradabilidade estima a biodegradabilidade do efluente através da relação da matéria orgânica prontamente biodegradável e matéria orgânica total, representada por DBO₅/DQO (ALBERTON, 2010).

4.9. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.9.1. Determinação de Atividade Lipolítica- Método Titulométrico

Neste método, utiliza-se o óleo de oliva como substrato para os ensaios de atividade frente à triacilgliceróis. Contudo, a determinação da atividade de lipases por titulometria é baseada no método proposto por Stuer *et al.* (1986), com modificações, segundo FERNANDES (2007). O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis.

O meio reacional para o substrato é previamente preparado na forma de emulsão. A emulsão é composta por solução de Tampão fosfato pH 7,0, goma arábica 10 % e pelo substrato óleo de oliva (1,0 mM). Os ácidos graxos liberados do substrato emulsificado pela ação da enzima à 37°C e pH 7,0 por 20 minutos, foram titulados com NaOH 50 mmol L⁻¹. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a liberação de 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade lipolítica foi determinada segundo a Equação 1.

Equação 1 Cálculo da Atividade

$$A = \frac{[(\Delta V / \Delta t)] \times [N(\text{NaOH})] \times Fc \times (60 \text{ sg})}{1000 \text{ mL} \times 1 \text{ min}}$$

Onde :

A : Atividade Enzimática (U/gSS – Unidades por grama de substrato seco)

ΔV : Variação dos volumes obtidos em cada tempo de fermentação

Δ t : Variação do tempo das fermentações realizadas

N : Normalidade da solução de hidróxido de sódio

F_c : Fator de correção obtido da padronização da base

4.9.2. Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

As micrografias do substrato (semente de girassol) antes e após a fermentação (pico máximo de produção de enzima), foram obtidas por um microscópio eletrônico de varredura (Tescan Vega 3) do LABCATPROBIO/UFPR/Campus Palotina. As amostras foram, anteriormente, cobertas com uma fina camada de ouro por um metalizado e depois fixadas em um suporte de amostra por meio de uma fita de carbono. Além das imagens, o equipamento contém um sistema de espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDS) (Penta FET Precision - Oxford), que permite uma avaliação semi-quantitativa da composição química (RIBEIRO *et al.*, 2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO

As análises foram realizadas nos laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em Toledo-PR.

As sementes de girassol (*Helianthus annuus*), foram adquiridas na região de Toledo-Paraná, no comércio local de Toledo, sendo submetidas a um processo de análise e avaliação das suas características físico químicas de acordo com os procedimentos descritos por ZENEON *et al.* (2008).

PARÂMETRO	UNIDADES	VALOR MÉDIO	DESVIO PADRÃO
Cinzas	mg O ₂ L ⁻¹	3,51%	0,34
Umidade	mg O ₂ L ⁻¹	4,44%	0,17
Teor de óleo	mg L ⁻¹	48,9%	0,12

Esses resultados demonstram que o girassol (*Helianthus annuus*), é um substrato viável, de baixo custo e de fácil obtenção para a produção de lipases fúngicas, logo tornando ótima opção para a fermentação e produção de enzimas.

Outras vantagens do uso do girassol (*Helianthus annuus*) é que o próprio material fermentado pode ser utilizado como suporte para a enzima, sendo empregado diretamente no meio reacional, como será demonstrado em experimentos posteriores neste trabalho.

5.2. ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES DE *Penicillium sumatrense* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

5.2.1. Cinética de Produção da Enzima

Nos estudos prévios avaliou-se a cinética de produção de lipases de *Penicillium sumatrense*, utilizando-se semente de girassol como substrato, durante 144 h de fermentação, a 27 °C, 60 % de umidade e granulometria do substrato entre 10 Mesh (2 mm) e 16 Mesh

(1,19 mm). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores de atividade lipolítica foram obtidos pelo método titulométrico. Os resultados são apresentados na Figura 6.

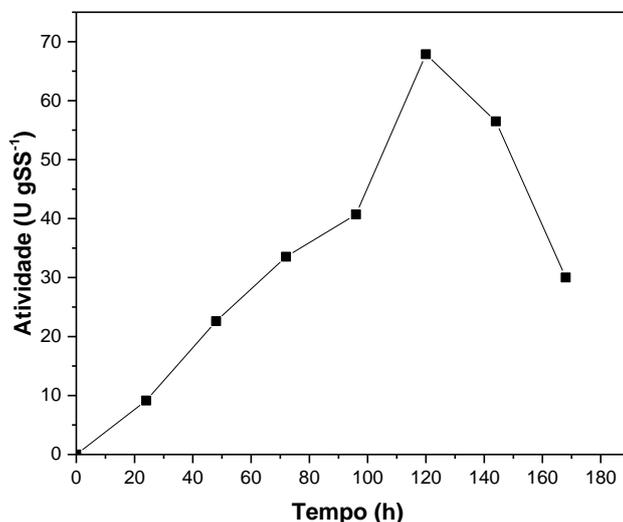


Figura 6 Cinética de produção de lipase fúngica de *Penicillium sumatrense* por fermentação no estado sólido (FES). Os ensaios foram realizados com umidade de 60 %. Experimentos realizados em triplicata com temperatura de 27°C.

Os resultados mostraram que inicialmente houve um aumento de atividade lipolítica com o tempo de fermentação (Figura 6), devido ao maior crescimento do microrganismo por maior disponibilidade de substrato. A maior atividade lipolítica (67,86 U gss⁻¹ ou 678,6 U) foi obtida após 96 h de fermentação.

Após o tempo de 96 h, nota-se uma diminuição dos valores de atividade lipolítica, provavelmente devido à diminuição da fonte de carbono dos óleos presentes no substrato (12,5%).

Analisando-se o teor dos óleos presentes no substrato, segundo ZENEBON *et.al.* (2008), verificou-se que no início da fermentação o valor era de 48,87 % e após 96 h de fermentação o valor reduziu para 12,5 %.

A queda na atividade lipolítica ocorre porque o fungo começa a produzir proteases para processar as outras fontes de carbono menos abundantes. Essas proteases são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas presentes em proteínas e outras enzimas, desnaturando e diminuindo a concentração de lipases (OLIVEIRA, 2013)

A fermentação no estado sólido (FES) apresenta uma série de vantagens para o cultivo de fungos, pois além de fornecer os nutrientes para o desenvolvimento microbiano ainda apresenta um ambiente ideal para o crescimento. O ambiente sólido e úmido favorece o

crescimento micelial, pois os fungos geralmente necessitam de uma superfície a qual possam se aderir (BARRIOS- GONZÁLES, 2012).

Um parâmetro importante para o crescimento e atividade microbiana no substrato é o tamanho das partículas (granulometria). Normalmente partículas menores fornecem uma grande superfície de contato com o microrganismo, mas resulta num baixo crescimento dos fungos. Em contrapartida, partículas maiores fornecem melhor aeração, troca gasosa e dissipação do calor, mas limitam a superfície de contato para o microrganismo. Portanto, a granulometria do substrato deve ser selecionada de acordo com cada processo em particular (PANDEY *et al.*, 1999).

Entre todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na FES em virtude do elevado grau de interação com os componentes sólidos, sendo que não há líquido livre no sistema (PANDEY *et al.*, 1999).

O teor de umidade pode influenciar o estado físico do substrato, a disponibilidade e a difusão de nutrientes e a troca de oxigênio e de CO₂ no meio. O elevado teor de umidade inicial pode afetar o crescimento do microrganismo, pois a porosidade do meio e a difusão de oxigênio são reduzidas, dificultando a formação do produto. Por outro lado, em baixos teores de umidade inicial, a produção enzimática também pode ser reduzida porque o fungo sofre modificações na membrana celular, conduzindo a limitações de transporte e afetando o metabolismo microbiano.

Quando a fermentação é conduzida com um alto índice de água livre, com uma umidade superior a 70%, permitindo que o fungo desenvolva suas estruturas orgânicas no interior da matriz de particulados do substrato, a fermentação será dita como submersa (BINOD *et al.*, 2015). Caso a fermentação ocorra com um índice reduzido de água livre no substrato, umidade inferior a 65%, fazendo com que o fungo se desenvolva sobre o material, sem adentrar completamente os poros nos sólidos, a fermentação será caracterizada como fermentação em estado sólido (BINOD *et al.*, 2015).

Portanto, o importante é trabalhar com uma umidade que mantenha o equilíbrio entre a disponibilidade de água, expansão do substrato e efeitos de difusão do oxigênio.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os obtido por Kruger (2017), que realizou estudos de produção de lipases de *Penicillium sumatrense* por FES através de um delineamento fatorial 2² utilizando-se a torta de crambe (*Crambe abyssinica hochst*) como substrato. Os melhores resultados foram obtidos com a granulometria de 28 Mesh, umidade

de 60 % e temperatura de 27 °C. A maior atividade lipolítica (243 U ou 24,3 U gss⁻¹) foi obtida após 96 h de fermentação.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são superiores (678,6 U) aos obtidos por Oliveira (2013), que utilizou a FES para obtenção de lipases de *Penicillium sumatrense* e *Aspergillus fumigatus*. Os melhores resultados foram obtidos com umidade de 65 %, temperatura de 30 °C e 72 h de fermentação. A cepa de *P. sumatrense* apresentou produção de 318,3 U em 10 g de sólido fermentado (farelo de semente de girassol), enquanto que *A. fumigatus* produziu 227,3 U, nas mesmas condições de cultivo.

5.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A fim de permitir uma visualização e maior compreensão da ação das enzimas do complexo enzimático foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) o substrato antes e após a fermentação em estado sólido (Figura 7).

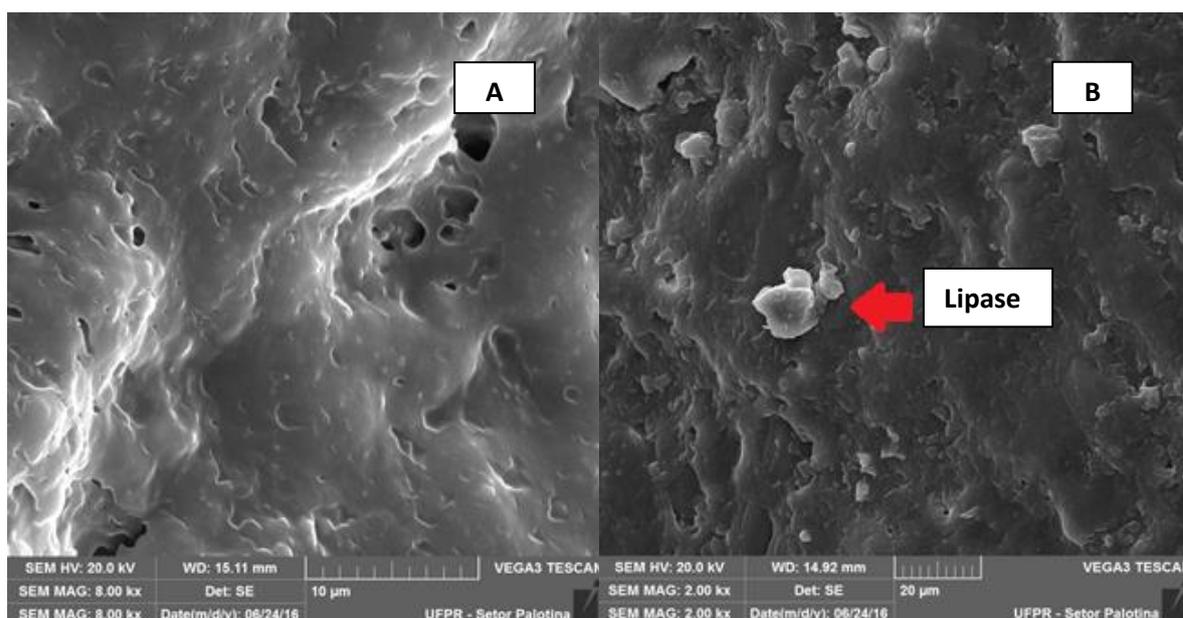


Figura 7. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) do substrato após a fermentação (A) e antes da fermentação (B).

Analisando-se a Figura 7, podemos verificar que o substrato antes da fermentação se mantém mais íntegro e homogêneo, e após a fermentação observa-se a lipase ligada na superfície do substrato. O resultado da análise em microscopia eletrônica mostrou uma importante mudança na morfologia ultraestrutural do farelo de semente de girassol (FSG) após a fermentação, resultado semelhante esse obtido também por KRUGER (2017), Ferraz

(2006) e Castilho (2016) que estudaram a morfologia de diferentes tortas após a fermentação em estado sólido.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

O efluente utilizado neste estudo foi cedido por uma Indústria de biodiesel na região Noroeste do Paraná. Os resultados obtidos na caracterização do efluente são descritos na Tabela 5.

Apenas o pH apresentou valor dentro dos parâmetros estabelecidos pela resolução CONAMA nº 430/2011, para lançamento de efluente. Os demais parâmetros apresentaram valores elevados, necessitando de tratamentos para seu posterior lançamento em corpos hídricos.

Tabela 5: Caracterização inicial da água residual de lavagem do biodiesel.

Parâmetros	Unidades	Valor Médio	Desvio Padrão	Padrão Conama
O&G	mg L ⁻¹	16,3	0,433	20
TURBIDEZ	UNT	50,0	1,89	100
pH	-----	5,74	0,150	5 a 9
ST	mg L ⁻¹	87,5	3,64	-----
DQO	mg de O ₂ L ⁻¹	4,18.10 ⁵	531	-----
DBO	mg de O ₂ L ⁻¹	4,43.10 ⁵	1,30	-----

Comparando-se os resultados obtidos na Tabela 5 com as condições de lançamento para efluentes em corpos hídricos, estabelecidas pelo CONAMA nº 430/2011, verifica-se a necessidade do enquadramento dos limites permitidos para rio classe 2 com relação ao teor de DBO , DQO, sólidos totais, óleos e graxas e turbidez (CONAMA, 2011).

5.4. BIORREMEDIAÇÃO DO EFLUENTE DE BIODIESEL

Os valores obtidos na caracterização do efluente de biodiesel após o processo de biorremediação estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Caracterização do efluente do biodiesel após o processo de biorremediação

Parâmetros	Unidades	Valor Médio	Desvio Padrão
O&G	mg L ⁻¹	2,30	0,170
TURBIDEZ	UNT	105	1,89
pH	-----	6,00	0,0667
ST	mg L ⁻¹	13,0	0,368
DQO	mg de O ₂ L ⁻¹	4,40. 10 ⁵	4,33
DBO	mg de O ₂ L ⁻¹	5,63. 10 ⁵	4,20

Os resultados demonstraram que houve uma redução de O&G, ST, DBO e DQO, sendo que o pH manteve-se próximo de 6,0. Estes parâmetros estão de acordo com estabelecidos pela resolução para lançamento de efluente. Apesar dos valores de turbidez ter aumentado 47 % após o processo de biorremediação, este parâmetro encontra-se dentro dos valores estabelecidos pelo CONAMA para fins de lançamento de efluentes nos rios (100 UNT) .

Na Tabela 6 é possível verificar que a biorremediação de efluentes de água residuária de lavagem do biodiesel com lipases foi eficiente em relação à degradação de óleos e graxas (O&G), que é o principal objetivo desta pesquisa. Verificou-se uma redução de 86% em 7 dias.

5.4.1. Determinação de Óleos e graxas (O&G)

Os valores de óleos e graxas (Figura 10) das águas de lavagem provenientes do biodiesel sem biorremediação apresentaram valores superiores (16,30 mg L⁻¹) de óleos e graxas em relação com relação ao processo de biorremediação (2,30 mg L⁻¹).

A Resolução CONAMA nº 430/2011 estabelece padrões de lançamento de efluentes com concentrações de óleos e graxas inferiores a 20 mg L⁻¹ para óleos minerais e 50 mg L⁻¹ de óleos vegetais e gorduras animais. Portanto, os teores de óleos e graxas nas águas de

lavagem do biodiesel encontram-se de acordo com os valores máximos permitidos pelo CONAMA.

Na Figura 11 é possível observar uma redução significativa no efluente após a biorremediação reduzindo-se 86,0 % dos óleos e graxas em 14 dias. Os resultados não sofreram alterações significativas após 14 dias.

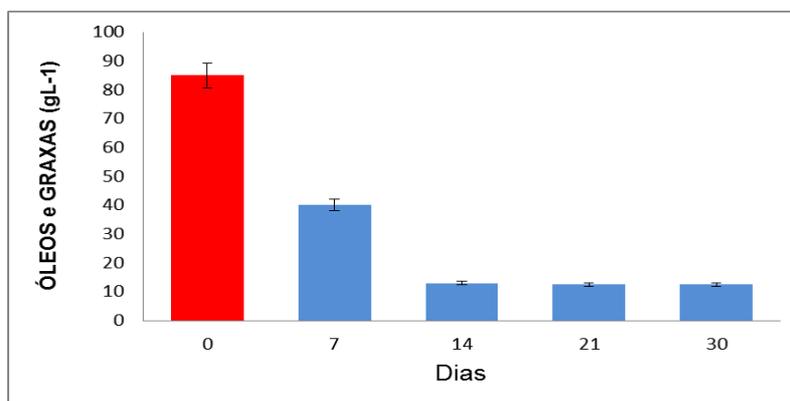


Figura 8 Valores de óleos e graxas das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel sem biorremediação e com biorremediação utilizando lipases de *Penicillium sumatrense*. Condições de ensaio: efluente sem biorremediação (■) e com biorremediação(■) Foram adicionados 100 mL de efluente, 678,6 U de atividade enzimática, 37 °C e 30 dias.

Este trabalho é inédito, uma vez que não foram encontrados artigos científicos e patentes que utilizam lipase fúngicas de *Penicillium sumatrense*, produzidas por FES, nos processos de biorremediação de O&G em águas residuárias de lavagem do biodiesel.

A maioria dos trabalhos reportados em literatura utilizam processos de flotação, coagulação e floculação no tratamento de efluentes de biodiesel (DAUD, ABDULLAH & HASAN, 2018; COSTA *et al.*, 2017; RATTANAPAN *et al.*, 2011). Estes tratamentos são eficientes na remoção de O&G, obtendo-se uma redução acima de 90%.

Foi encontrado um trabalho na literatura, no qual a autora realizou um pré-tratamento biológico da água residuária de lavagem do biodiesel por microrganismos (*Klebsilla oxytoca*) produtores de lipases. Da Rocha (2010) realizou um pré-tratamento biológico da água residuária de lavagem do biodiesel por microrganismos (*Klebsilla oxytoca*) produtores de lipases. A cepa dessa bactéria foi cultivada à 35 °C, 48 h e 180 rpm num agitador rotativo A autora verificou uma redução de 60 % de O&G após 48 h de tratamento como os microrganismos.

O trabalho de Da Rocha (2010) difere desta pesquisa, pois enquanto a autora utilizou bactérias para ao tratamento do efluente de biodiesel utilizou-se sólidos fermentados contendo lipases.

Apesar de não ser possível a comparação direta deste trabalho com artigos científicos semelhantes, podemos comparar com tratamentos enzimáticos de efluentes com alto teor de O& G, como efluentes de petróleo, abatedouros e laticínios.

Verma *et .al.* (2012) utilizaram lipase produzida pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* na biorremediação de águas residuais contaminadas com óleo bruto de petróleo. A cepa dessa bactéria foi cultivada à 35 °C , 48 h e 180 rpm num agitador rotativo. O inóculo foi incubado com petróleo bruto em águas residuais contaminadas para avaliar a capacidade de biorremediação. As amostras foram analisadas a cada 24 horas. Após sete dias de tratamento, o teor de óleo bruto foi reduzido em 82,8%.

Silva (2011) também aplicou lipases de *Penicillium* sp., produzidas por FES para biorremediação, visando a redução de óleos e graxas totais de um efluente industrial de um abatedouro da região metropolitana de Curitiba. Silva (2011) verificou que após 11 dias de tratamento enzimático em *shaker* à 30°C e 300 rpm, o teor de óleos e graxas totais reduziu 80,0%.

Alberton (2010) utilizou lipases fúngicas de *Rhizopus microsporus* produzidas por FES para redução de O&G no efluente de laticínio. A autora verificou após 72 h de tratamento enzimático à 35°C, uma redução de 80 % de O&G no efluente.

5.4.2. Determinação da Turbidez

Com relação à turbidez, verifica-se uma maior turbidez encontrada nas águas de lavagem do biodiesel após a biorremediação em relação ao efluente sem biorremediação (Figura 12).

Observa-se um valor inicial de 49,0 UNT proveniente da lavagem do biodiesel sem biorremediação e um valor máximo de 104 UNT com biorremediação.

A Resolução CONAMA N° 430, Art. 3 (2011) estabelece valores de turbidez para lançamentos de efluentes, mas afirma que nos corpos receptores a turbidez não pode ultrapassar 100 UNT (unidades nefelométricas de turbidez).

Neste caso os valores após o processo de biorremediação encontram-se dentro dos valores estabelecidos pelo CONAMA para fins de lançamento de efluentes nos rios.

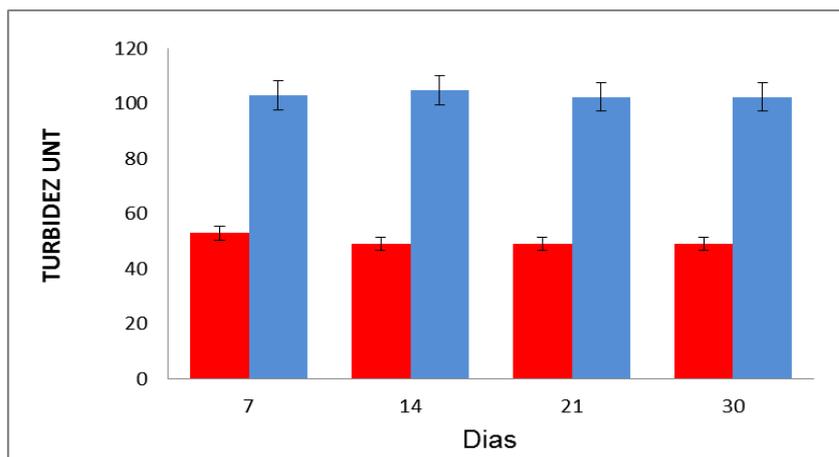


Figura 9 Valores de Turbidez das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel com biorremediação e sem biorremediação utilizando lipases de *Penicillium sumatrense*. Condições de ensaio: efluente sem biorremediação (■) e com biorremediação (■). Foram adicionados 100 mL de efluente, 678,6 U de atividade enzimática, 37 °C e 30 dias.

Um alto valor de turbidez diminui a eficiência de tratamentos e interfere na condição estética da água, prejudicando a fotossíntese e interferindo nos equilíbrios naturais.

Nesta pesquisa, verificou-se um aumento de 47 % no valor de turbidez nas águas de lavagem do biodiesel após a biorremediação. Isto ocorreu provavelmente devido às partículas em suspensão ou colóides.

Apesar deste aumento próximo à 50 %, este parâmetro encontra-se de acordo com as condições de lançamento para efluentes em corpos hídricos, estabelecidas pelo CONAMA, na Resolução 357/05 para os limites permitidos de turbidez para rio classe 2 (CONAMA, 2011).

5.4.3 Determinação do pH

Foi observado neste experimento, que não houve variação em relação ao pH nas águas de lavagem proveniente do biodiesel antes e após o processo de biorremediação.

Observa-se na Figura 13, um valor máximo de pH de 5,96 no efluente de biodiesel sem a biorremediação e 5,76 no efluente biorremediado.

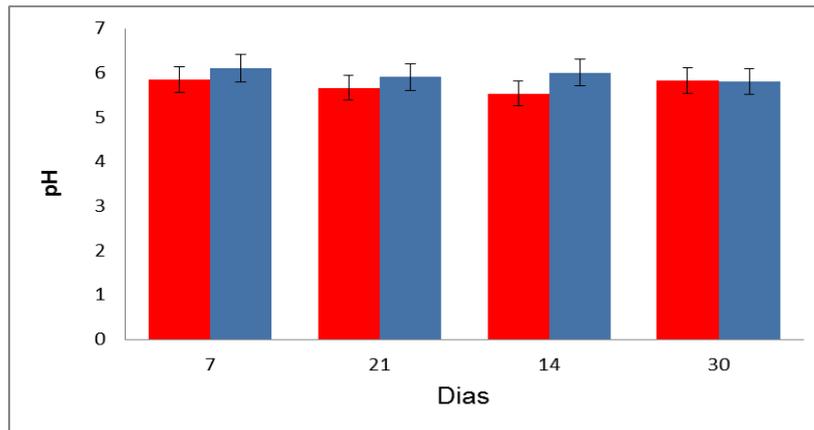


Figura 10 Valores de pH das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel sem Biorremediação e com biorremediação com biorremediação e sem biorremediação utilizando lipases de *Penicillium sumatrense*. Condições de ensaio: efluente sem biorremediação (■) e com biorremediação (■). Foram adicionados 100 mL de efluente, 678,6 U de atividade enzimática, 37 °C e 30 dias.

Observa-se que os valores de pH das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel antes e após a biorremediação foram próximos, sendo que este parâmetro está de acordo com o recomendado pela resolução do CONAMA nº 430/2011, que fixa o pH entre 5,0 a 9,0 para condições de lançamento de efluentes (CONAMA, 2011).

5.4.4. Determinação de Sólidos Totais (ST)

Os sólidos totais contribuem para o aumento da matéria orgânica, e vão diminuir a eficiência do sistema, uma vez que os microrganismos demoram mais para degradá-los. Os sólidos suspensos são aqueles que flutam na superfície do rio, formando uma crosta que pode impedir a penetração da luz solar e também contribui para o aumento da temperatura do rio. No efluente estudado neste trabalho, obteve-se um de 80 mg L⁻¹ antes da biorremediação e 12,4 mg L⁻¹ de sólidos totais no efluente (Figura 10).

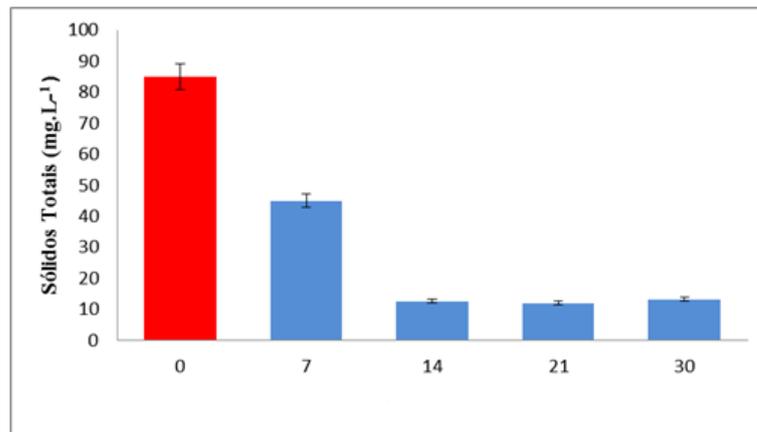


Figura 11 . Valores sólidos totais (ST) das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel com e sem biorremediação utilizando lipases de *Penicillium sumatrense*. Condições de ensaio: efluente sem biorremediação (■) e com biorremediação (■). Foram adicionados 100 mL de efluente, 678,6 U de atividade enzimática, 37 °C e 30 dias.

Na figura 10 observa-se uma redução de 84,5 % de sólidos totais (ST) após a biorremediação do efluente das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel, indicando que o processo foi eficiente com relação à redução de ST.

A Resolução CONAMA nº 430/2011 não estabelece padrões de lançamento de efluentes com concentrações de sólidos totais. Alberton (2010) encontrou o valor de 23,89 mg.L⁻¹ sólidos totais no efluente de biodiesel, estando semelhante ao resultado encontrado.

5.4.4. Determinação da Demanda química de oxigênio (DQO)

A Demanda Química de Oxigênio é a medida da quantidade de oxigênio equivalente ao conteúdo de matéria orgânica e outras de uma amostra que é suscetível à oxidação por um forte oxidante químico (ALBERTON, 2010; BRAILE & CAVALCANTI, 1993).

A DQO é indispensável na caracterização de efluentes industriais e de esgoto sanitário, pois ela avalia a quantidade de oxigênio dissolvido (OD) consumido, em meio ácido, que leva à degradação de matéria orgânica. A análise dos valores de DQO em efluentes e em águas de superfície é uma das mais expressivas para determinação do grau de poluição da água. Esta análise reflete a quantidade total de componentes oxidáveis, seja carbono ou hidrogênio de hidrocarbonetos, nitrogênio de proteínas, por exemplo, ou enxofre e fósforo de detergentes (LINS, 2010).

A DQO pode ser considerada como um processo de oxidação química, empregando-se o dicromato de potássio como agente oxidante, onde o carbono orgânico de um carboidrato, por exemplo, é convertido em gás carbônico e água. O poder de oxidação do dicromato de potássio é maior do que o que resulta mediante a ação de microrganismos. A resistência de substâncias aos ataques biológicos levou à necessidade de fazer uso de produtos químicos, sendo a matéria orgânica neste caso oxidada mediante um oxidante químico. A DQO é muito útil quando utilizada juntamente com a DBO para observar a biodegradabilidade de despejos (ZUCCARI *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados na Figura 8, demonstram que há um aumento da DQO após o processo de biorremediação. O valor aumentou de 419 mg L⁻¹ para 440 mg L⁻¹ após 14 dias, um aumento de 4,8 %.

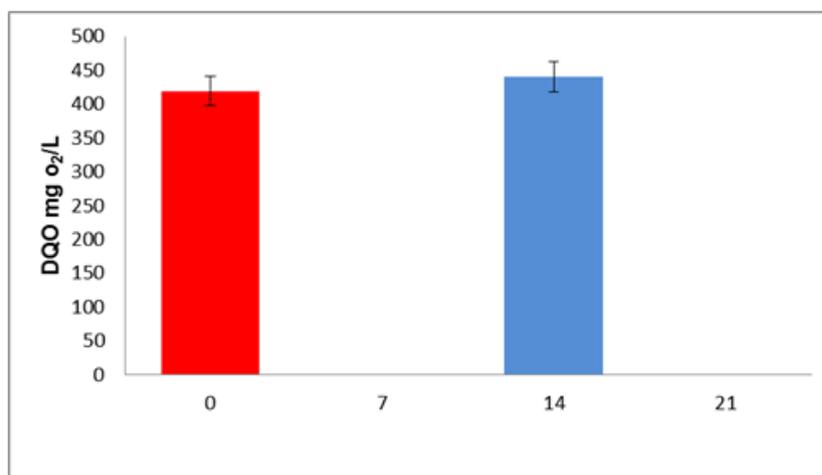


Figura 12 Valores da Demanda química de Oxigênio (DQO) das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel com e sem biorremediação utilizando lipases de *Penicillium sumatrense*. Condições de ensaio: efluente sem biorremediação (■) e com biorremediação (■) Foram adicionados 100 mL de efluente, 678,6 U de atividade enzimática, 37 °C e 14 dias.

A resolução CONAMA nº 430/2011 não estabelece valores de DQO para lançamento de efluentes. Porém os resultados encontrados se encontram bem a baixo de outros efluentes de biodiesel. Alberton (2010) obteve o valor da DQO 81.748,38 mg O₂/L antes do tratamento, após o tratamento obteve 37,31% de remoção, apresentando uma concentração muito elevada.

5.4.5. Determinação da Demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅)

A DBO₅ corresponde à quantidade de oxigênio consumida pelos microrganismos de esgoto ou águas poluídas na oxidação biológica da matéria orgânica, quando mantida a uma

dada temperatura (20°C) por um intervalo de tempo convencional (5 dias) (BRAILE & CAVALCANTI, 1993).

A DBO é de fundamental importância em estudos sobre a qualidade de águas, bem como para projetos e controle operacional de Estações de Tratamento de Efluentes. Também, serve como base para estudos de autodepuração natural de um corpo aquático (PIVELI, 2001).

Nas águas naturais a DBO representa a demanda potencial de oxigênio dissolvido que ocorre devido à estabilização dos compostos orgânicos biodegradáveis, podendo trazer os níveis de oxigênio nas águas abaixo dos exigidos pelos peixes, levando-os à morte. É uma variável da qualidade da água que, de certa forma, quantifica a poluição orgânica pela depleção do oxigênio, conferindo condição anaeróbia ao ecossistema aquático, pela oxidação da matéria orgânica biodegradável.

Observando-se os resultados apresentados na Figura 9, nota-se elevados valores de DBO₅, indicando a presença de matéria orgânica nas águas de lavagem.

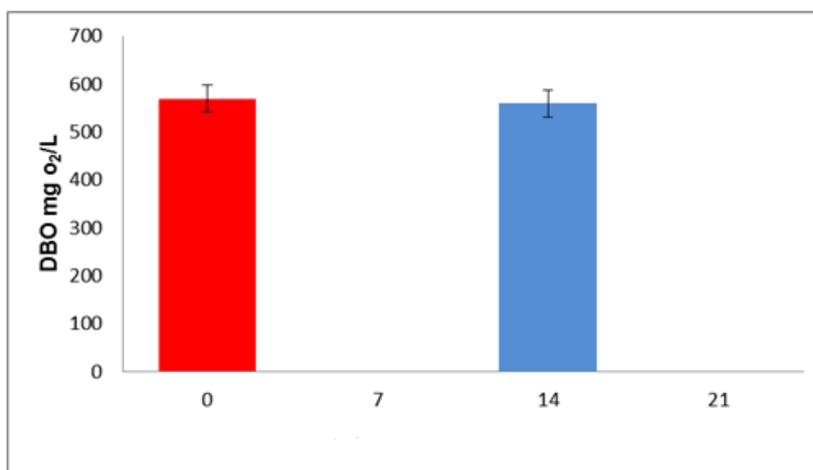


Figura 13. Valores da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) das águas de lavagem provenientes da purificação do biodiesel com e sem biorremediação utilizando lipases de *Penicillium sumatrense*. Condições de ensaio: efluente sem biorremediação (■) e com biorremediação(■) Foram adicionados 100 mL de efluente, 678,6 U de atividade enzimática, 37 °C e 14 dias.

Após 14 dias de biorremediação houve redução da DBO em (7%), a resolução CONAMA nº 430/2011 não estabelece valores de DBO₅ para lançamentos de efluentes, pode-se inferir que o despejo de efluentes com alta DBO irá provocar o consumo de oxigênio do corpo receptor, podendo chegar a níveis baixos de oxigênio total dependendo do tipo de

bactéria existente naquele meio. Muitas vezes, a falta de oxigenação da água só será perceptível a muitos metros ou quilômetros a jusante do ponto de lançamento (MANAHAN, 2006).

5.4.7. . Determinação da razão de biodegradabilidade do efluente (DBO₅/ DQO)

A razão de biodegradabilidade estima a biodegradabilidade do efluente através da relação da matéria orgânica prontamente biodegradável e matéria orgânica total, representada por DBO₅/DQO (ALBERTON, 2010).

A razão DBO₅/ DQO obtida para o efluente desta pesquisa foi de 1,30.

Razões menores do que 0,6 estimam baixa biodegradabilidade do efluente, ou seja, a matéria orgânica do efluente seria pobremente metabolizada por microrganismos dos tratamentos biológicos convencionais (aeróbio e anaeróbio) (ALBERTON, 2010; JANCZUKOWICZ; ZIELIŃSKI & DĘBOWSKI, 2008; DANALEWICH *et al.* 1998).

O valor da razão DBO₅/ DQO obtida nesta pesquisa indica uma boa biodegradabilidade do efluente estudado pelas lipases fúngicas de *Penicillium sumatrense*.

6. CONCLUSÕES

Os resultados dos estudos do presente trabalho permitiram concluir que:

(1) Na produção da lipase de *Penicillium sumatrense* por FES

- As melhores condições de fermentação foram 60 % de umidade, 27 °C, 60 % de umidade e granulometria do substrato entre 10 Mesh 16 Mesh. A maior atividade lipolítica (67,86 U gss⁻¹ ou 678,6 U) foi obtida após 96 h de fermentação para o substrato farelo de semente de girassol (FSG).

(2) Nos estudos de Biorremediação

(i) Por adição direta do sólido fermentado:

- A lipase de *Penicillium sumatrense* mostrou-se viável nos processos de biorremediação de efluentes de água residuária de biodiesel por adição do sólido fermentado contendo a lipase, com o substrato de fermentação FSG.
- Os resultados indicaram que após a biorremediação houve uma redução em todos os parâmetros avaliados estando de acordo com a Resolução CONAMA 430/2011.
- A maior redução ocorreu no teor de óleos e graxas (86 %) em 14 dias de biorremediação.
- Apesar de a DQO ter reduzido apenas 5,0 % e a DBO 7%, a razão de biodegradabilidade do efluente (DBO₅/ DQO) foi de 1,30 indicando uma boa biodegradabilidade do efluente de biodiesel estudado neste trabalho.
- O teor de sólidos totais (ST) reduziu 84,5 % e o pH manteve-se em 5,76.
- Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa verificou-se um tratamento eficiente onde as águas residuárias da indústria de produção de biodiesel poderão ser utilizadas para fins de lançamento ou reuso no processo industrial minimizando a geração de efluentes nas estações de tratamento.

Os resultados apresentados neste trabalho são originais em três aspectos fundamentais:

(1) na produção de lipases por FES usando um fungo endofítico isolado das folhas de mamona (*Ricinus communis* L.), (2) na utilização do sólido fermentado contendo a enzima diretamente no processo de biorremediação de óleos e graxas (O&G) e (3) e na originalidade desta pesquisa, que é inédita. Não foram encontrados artigos científicos e patentes relacionados ao tema estudado nesta pesquisa.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este é um trabalho que abre muitas novas perspectivas. Trabalhos futuros poderão abordar temas como, por exemplo:

- Estudo comparativo da capacidade de biorremediação da lipase de *Penicillium sumatrense*, produzida por FES, utilizando-se a adição direta do sólido fermentado em batelada alimentada, a enzima livre e a enzima imobilizada em suportes hidrofóbicos, em reações de hidrólise de O&G, para fins de lançamentos e reutilização da água residuária de lavagem do biodiesel.
- Otimizar a reação de hidrólise de O&G, reduzindo o tempo de hidrólise.
- Empregar métodos de análise instrumental, tais como Infravermelho, CLAE e RMN-¹H, para a caracterização dos produtos obtidos na biorremediação.
- Estudar a capacidade de catálise das lipases em outros efluentes com elevados teores de O&G, como por exemplo, os efluentes das indústrias de laticínios.

8. REFERÊNCIAS

- ALBERTON, D. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido visando á aplicação no tratamento de efluentes de laticínios.** 173f. Tese de Doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, 2010.
- ALVES, F.V., JÚNIOR, A.S., SANTANA, D.G., SANTOS, C.M. Composição química e qualidade fisiológica de sementes de girassol de plantas submetidas à competição intraespecífica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, p. 457-465, 2012.
- ANUÁRIO estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis. 2016. Disponível em: <http://anp.gov.br>.
- ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biocombustíveis – panorama geral.** 2016. Disponível em: http://www.anp.gov.br/wwwanp/images/publicacoes/Anuario_Estatistico_ANP_2016.pdf.
- ANP-Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biocombustíveis-panorama geral.** 2012. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/dados-estatisticos>.
- ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biocombustíveis – panorama geral. Resolução ANP nº 42 de 24/11/2004,** disponível em <http://www.anp.gov.br>.
- ANDRADE, J.A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I.C.S.F. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados.** Eclética Química, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.
- ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. **Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v.7, n.1, p. 257-270. 2016.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 22nd edition. Edited by RICE, E.W.; BAIRD, R.B.; EATON, A.D. AND CLESCERI, L.S. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF), Washington, D.C., USA. 2012.
- ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; ABDUL AZIZ, A.R.; SULAIMAN, N.M.N. **Membrane biodiesel production and refining technology: A critical review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 15, n. 9, p. 5051-5062, 2011.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; ABDUL AZIZ, A. R.; SULAIMAN, N. M. N. **Refining technologies for the purification of crude biodiesel**. Applied Energy, v. 88, n. 12, p. 4239-4251, 2011.

BABICZ, I. **Produção de diacilglicerois via hidrólise enzimática do óleo de palma**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências e Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 2009.

BARRIOS- GONZÁLES, J. **Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications**. Process Biochemistry. v.47, n.2, p. 175-185, 2012.

BARON, A.M.; SARQUIS, M.I.M.; BAIGORI, M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. **A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments**. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, v. 34, n. 1-6, p. 25-32, 2005.

BARON, A.M. **Biocatálise em ambientes aquo-restritos: comparação de diferentes sistemas reacionais**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, 2003.

BASU, P.; SADHUKHAN, A. K.; GUPTA, P.; RAO, S.; DHUNGANA, A.; ACHARYA, B. **An Experimental and Theoretical Investigation on Torrefaction of a Large Wet Wood Particle**. Bioresource. Technology, p.159 -215, 2014.

BAYOUMI, R.A.; ATTA, H.M.; EL-SERAWY, M.H. **Bioremediation of khorma Slaughter House wastes by Production of Thermoalkali stable Lipase for Application in Leather Industries**. Life Science Journal, v.9, n.4, p. 1324-1335, 2012.

BERGER, T. M. **Biorremediação de solos contaminados com Hidrocarbonetos Totais de Petróleo – Enfoque na aplicação do processo Terraferm**. 286 f. Tese de Doutorado, Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BINOD, P.; PANDEY, A., SINDHU, R. **Solid-State Fermentation for the production of Poly(hydroxyalkanoates)**. Chemical and Biochemical Engineering. v .9, p. 173–181, 2015.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Interciência, 2008.

BRASIL. Portaria nº 2914. Estabelece os procedimentos relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 12 dez. 2011.

BOTTON, V.; PIOVAN, L.; MEIER, H.F.; MITCHELL, D.A.; CORDOVA, J.; KRIEGER, N. **Optimization of biodiesel synthesis by esterification using a fermented solid produced**

by *Rhizopus microsporus* on sugarcane bagasse. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 41, p. 573-583, 2018.

BRAILE, P.M.; CAVALCANTI, J.E.W.A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, CETESB, São Paulo, 764f, 1993.

CANDEIA, R.A. **Biodiesel de soja: síntese, degradação e misturas binárias**. Tese Doutorado em Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, 2008.

CARNEIRO, D.A.; GARIGLIO, L.P.A. **Biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos**. *Revista Tecer*, v.3, n.4, 2010.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. **Aplicações de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados**. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 75 -80, 2003.

CASTELLANI, A.A. **Maintenance in cultivation of the common pathogenic fungi of man. In sterile distilled water. Further researches**. *Journal of Tropical Medicine*. London, v. 70, 1967.

CASTILHO, L.; CASTRO, A.; FREIRE, A. **Characterization of babassu, canola, castor seed and sunflower residual cakes for use as raw materials for fermentation processes**. *Industrial Crops and Products*. v.83. n.1, p.140-148, 2016.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIR, C.L. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. *Química Nova*, v.27, n.1, p. 146-156, 2004.

CAVALLARI, P.I.; **Avaliação dos processos de purificação do biodiesel por via seca**. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, 2012.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia Enzimática**. Petrópolis-RJ: Editora EPUB, 2008.

COELHO, MARCELA F. **Estudo do uso de fertilizante NPK imobilizado na Biorremediação de derrames de petróleo no mar Simulação em laboratório**. 36 f. Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Engenharia de Exploração e Produção de Petróleo, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé/RJ, 2005.

COLLA, L.M.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. **Aplicações e produção de lipases microbianas**. *Revista de Ciências Exatas Aplicadas e Tecnológicas da Universidade de Passo Fundo*, v.4, p. 1-14, 2012.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE – CONAMA. Legislação Ambiental Federal, **Resolução nº 430**, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e da outras providências.

CONTESINI, F.J.; LOPES, D.B.; MACEDO, G.A.; NASCIMENTO, M.G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus sp.* **lipase: Potential biocatalyst for industrial use**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 67, 163–171, 2010.

COSTA, N.M.; SILVA, V.M.; DAMACENO, G.; SOUSA, R.M.F.; RICHTER, E.M.; MACHADO, A.E.H.; TROVÓ, A.G. Integrating **coagulation-flocculation and UV-C or H₂O₂/UV-C as alternatives for pre or complete treatment of biodiesel effluents**. Journal of Environmental Management, v. 203, p. 229-236, 2017.

COSTA, C.R.; OLIVI P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Química Nova, vol 31, p. 1820-1830, 2008.

COUTINHO, P.W.R.; CADORIN, D.A; NORETO L.M.; GONÇALVES JÚNIOR, A.C. **Alternativas de remediação e descontaminação de solos: biorremediação e fitorremediação**. Nucleus, v. 12, p. 59-68, 2015.

COUTINHO, R.C.; GOMES, C.C. **Técnicas para remediação de aquíferos contaminados por vazamentos de derivados de petróleo em postos de combustíveis**. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, 17, 2007.

DA ROCHA, D.C. **Pré-tratamento biológico da água residuária de lavagem do biodiesel de óleo de soja por micro-organismos produtores de lipases**. 70f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola, Unioeste, Cascavel, 2010.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros**. Química Nova, v. 27, n. 4, p. 623-639, 2004.

DANALEWICH, J.R.; PAPAGIANNIS, T.G.; BELYEA, R.L.; TUMBLESÓN, M.E.; RASKIN, L. **Characterization of dairy waste streams current treatment practices, and potential for biological nutrient removal**. Water Research, v. 32, n. 12, p. 3555-3568, 1998.

DAUD, N.M.; ABDULLAH, S.R.S.; HASAN. H.A. **Response surface methodological analysis for the optimization of acid-catalyzed transesterification biodiesel wastewater pre-treatment using coagulation–flocculation process**. Process Safety and Environmental Protection, v. 113, p. 184–192, 2018.

DE BONI, L.A.B.; GOLDANI, E.; MILCHAREK, C.D.; DOS SANTOS, F.A. **Tratamento Físico-Químico da Água de Lavagem Proveniente da Purificação do Biodiesel**. Periódico Tchê Química, v. 4, n. 41, 2007.

DIAS, G.S.; LUZ JR, L.F.L.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Scale-up of biodiesel synthesis in a closed-loop packed-bed bioreactor system using the fermented solid produced by *Burkholderia lata* LTEB11. *Chemical Engineering Journal*, v. 316, p. 341–349, 2017.

DOS SANTOS, F.; REZENDE, C.A.; MARTÍNEZ, J. **Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide**. *The Journal of Supercritical Fluids.*, v. 107, 2016.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Coleção Biotecnologia. Ed. Educus, Caxias do Sul, 2004.

FAUSTINO, A. S. **Estudo físico-químico do efluente produzido por fossa séptica biodigestora e o impacto do seu uso no solo**. Universidade Federal de São Carlos, 2011.

FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, 2007.

FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; RAMOS, L.P., MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. **Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 44, p. 8-13, 2007.

FERRAZ, A. M. **Síntese via enzimática de ésteres com lipases imobilizadas em filmes de dextrana**. 55 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

FOJAN, P. J, P.H., PETERSEN, M.T.N., PETERSEN, S.B. **What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach**. *Biochimie*, p. 1033–1041, 2000.

FUREBY, C; TABOR, G; WELLER, H.G; GOSMAN, A.D. **A comparative study of subgrid scale models in homogeneous isotropic turbulence**. *Physics of Fluids*. v.9, n.5, 1997.

GAMBA, M. **Produção de Biodiesel através de Catálise Enzimática em Líquido Iônico**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

GANDHI, N.N. **Applications of lipases**. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.74, n.6, p. 621-634, 1997.

GAZZONI, D.L. História e biodiesel. Portal Biodiesel Br. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/historia/biodiesel-historia.htm>.

GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.L.; MANFIO, G.P. **Biorremediação-Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, n.34, p.36-43, 2005.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. 2016. Enzymes Market Size By Product (Proteases, Lipases, Carbohydrases, Polymerases & Nucleases), By Application (Detergents, Food & beverages, Animal Feed, Biofuels), Industry Analysis Report, Regional Outlook, Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2016–2024. Available from <https://www.gminsights.com/industry-analysis/enzymes-market>.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. **Energias renováveis: um futuro sustentável**. Revista USP, n. 72, 2007.

GRACIANE, F. Production of lipolytic enzymes by bacterials isolated from biological effluent treatment systems. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; & RATHI, P. **Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 64, p. 763-781, 2004.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S. & RAI, V. **A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond**. BioMed Research, 2013.

HAJAR, M.; VAHABZADEH, F. **Production of a biodiesel additive in a stirred basket reactor using immobilized lipase: kinetic and mass transfer analysis**, Korean Journal Chemical Engineering, v. 33, p. 1220–1231, 2016.

HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. **Developments in industrially important thermostable enzymes: a review**. Bioresource Technology p.17-34, 2003,

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases**. Enzyme and Microbial Technology, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

JACQUES, R.J.S.; BENTO. M.F.; ANTONIOLLI, I.Z; CAMARGO, A.F. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JACQUES, R.J.S.; SILVA, K.J.; BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O. **Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas**. Ciência Rural, v.40, n.2, p.280-287, 2010.

- JANCZUKOWICZ, W.; ZIELIŃSKI, M.; DEBOWSKI, M. **Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production.** *Bioresource Technology*, v. 99, n. 10, p. 4199-4205, 2008.
- JOHNSON, V.; SIGH, M.; SAINI, V.S. **Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30.** *Biotechnology Letters*, v.14, n.6, p. 487-490, 1992.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual do biodiesel.** 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.
- KNOTHE, G. **Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters.** *Fuel Processing Technology*. v. 86, p. 1059 -1070, 2005.
- KNOTHE, G. **Perspectivas históricas de los combustibles diesel basados em aceites vegetales.** *Revista A&G*, v. 47, Tomo XII, nº.2, 2001.
- KRAWCZYK, T. **Biodiesel: Alternative fuel makes inroads but hurdles remain.** *Inform 7*, 1996.
- KRÜGER, C. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise.** 86 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2017.
- LAGE, F.A.P.; BASSI, J.J.; CORRADINI, M.C.C.; TODERO, L.M.; LUIZ, J.H.H.; MENDES, A.A. **Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system.** *Enzyme and Microbial Technology*. v. 84, p. 56–67, 2016.
- LIMA, M.T.S.; SOUZA, M.C. **Uso das Termelétricas no Brasil.** *Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM, Santa Maria*, v.37, Ed. Especial, p. 17-23, 2014.
- LIMA, D.F. **Biorremediação em sedimentos impactados por petróleo na Bahia de todos os Santos, Bahia: Avaliação da degradação de hidrocarbonetos saturados.** Dissertação de Mestrado, Programa da Pós Graduação em Geologia, Universidade Federal da Bahia, 2010.
- LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N., MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C., FILLIPPIS, I.; FONTANA, J.D. **Kinetic characterization and stability in aqueous media and in organic solvents of a crude lipase preparation obtained from *Penicillium aurantiogriseum*.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 18, p. 65-71, 2004.
- LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M.I.M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J. D. **Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*.** *Food Technology and Biotechnology*, v.41, p.105-110, 2003.

LIMA, U.A; AQUARONI. E; BORZANI.W. BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL. São Paulo: Edgar Blucher LTDA v3, 2001

LI, J.; LI, L.; TONG, J.; WANG, Y.; CHEN, S. **Research development on lipase catalyzed biodiesel**. Energy Procedia, v. 16, p. 1014- 1021, 2012.

LINS, G. A. **Impactos Ambientais em Estações de Tratamento de Esgotos: ETEs**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Escola Politécnica e Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ, 2010.

LUQUE, R.; MELERO, J.A
Advances in biodiesel production: Processes and Technologies. Spain: Woodhead Publishing, p. 1- 8, 2012.

MACEDO, I.C.; NOGUEIRA L.A.H. **Avaliação do biodiesel no Brasil**. Brasília: Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, 2005.

MADALOZZO, A.D.; MARTINI, V.P.; KUNIYOSHI, K.K.; DE SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; GLOGAUERD, A.; ZANINE, G.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. **Immobilization of LipC12, a new lipase obtained by metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 116, p. 45–51, 2015.

MARTINS, V.; KALIL, S.; COSTA, J. **Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos**. Química Nova, v. 31, n. 8, p 1942-1947, 2008.

Ministérios de Minas e Energia (MME)- Disponível <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html>.

MEHER, L. C.; SAGAR, D.V.; NAIK, S.N. **Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a Review**. India. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 10, p. 248-268, 2006.

MESSIAS, J.M.; DA COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G.; GIEISE, E.C.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. **Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, v.32, n.2, p.213- 234, 2011.

MONTEIRO. V.N.; SILVA, R.N. **Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática**. Revista Processos Químicos, v. 3, nº 5, p. 9-23, 2009.

MOREIRA, J.R.; GOLDEMBERG, J. **The alcohol program**. Energy Policy, v. 27, n. 4, p. 229-245, 1999.

- MORAIS, M.C.; CORIOLANO, A.C.F. **Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera.** *Holos*, v. 7, p. 143, 2016.
- NOVICKI, C.; CAMPOS, R.F.F. **Análise da potabilidade das águas de fontes naturais, junto ao município de Fraiburgo/SC.** *Revista Monografias Ambientais – REMOA*. v.15, n.1, p.323-336, 2016.
- OLIVEIRA, A.C. **síntese enzimática do biodiesel de microalgas a partir de lipases produzidas por fungos endofíticos.** 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais) Departamento de Microbiologia e Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- OLIVEIRA, A.C.D.; WATANABE, F.M.F.; VARGAS, J.V.C.; RODRIGUES, M.L.F.; MARIANO, A.B. **Production of methyl oleate with a lipase from an endophytic yeast isolated from castor leaves.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.1, p. 295-300, 2012.
- OLIVEIRA F.C.C.; SUAREZ P.A.Z.; DOS SANTOS, W.L.P. **Biodiesel: Possibilidades e Desafios.** *Química e Sociedade*, n. 28, 2008.
- ORLANDELLI, R.C. **Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações.** *SaBios: Revista de Saúde e Biologia*, v.7, n.3, p.97-109, 2012.
- OHE, T.H K. **Produção de Biodiesel Etilico com uso de Lipase Extracelulares de Fungos Termofílicos.** Dissertação de Mestrado em Química. Universidade e Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.
- PANDEY, A; BENJAMIN, S; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. **The realm of microbial lipases in biotechnology.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 29, n. 2, p. 119-131, 1999.
- PARENTE, E.J.S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado.** Fortaleza: Tecbio, 66 p, 2003.
- PARRON. L.; FREITAS, H. Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. Embrapa, 2011.
- PEREIRA, A.R.B.; FREITAS, D.A.F. **Uso de microorganismos para a biorremediação de ambientes impactados.** *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*. p 6, 975. 2012.
- PICCIN, J.S. **Purificação de biodiesel por adsorventes: uma revisão.** *Vetor*, Rio Grande, v.25, n 2, p.68-75, 2015

- PIVELI, R. P. **Curso Qualidade das Águas e Poluição: Aspectos FísicoQuímicos**, Notas de aula, EEUSP, 25 p. 2001..
- SUAREZ, P.A.Z. **History and policy of biodiesel in Brazil**. Energy Policy, v. 35, n. 11, p. 5393-5398, 2007.
- RAMOS, L.P.; KOTHE, V.F.; OLIVEIRA, C.; APARECIDA, M.S.; MUNIZ-WYPYCH, A.; NAKAGAKI, S.; KRIEGER, N.; WYPYCH, F.; CORDEIRO, C. **Biodiesel: Raw Materials, Production Technologies and Fuel Properties**. Revista Virtual de Química, v. 9, p. 317-369, 2017.
- RAMNATH, L.; SITHOLE, B. & GOVINDEN, R. **Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry**. Canadian Journal of Microbiology, v. 63, p. 179–192, 2017.
- RATTANAPAN, C.; SAWAIN, A.; SUKSAROJ, T.; SUKSAROJ, C. **Enhanced efficiency of dissolved air flotation for biodiesel wastewater treatment by acidification and coagulation processes**. Desalination, v. 280, p. 370–377, 2011.
- RIBEIRO, C.; SCHEUFELE, F. B.; MODENES, A. N.; VIEIRA, V. **Characterization of *Oreochromis niloticus* fish scales and assessment of their potential on the adsorption of reactive blue 5G dye**. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. v. 482, n.1,p.693-701, 2015.
- RICHTER, C. A.; NETTO, J.M.D.A. **Tratamento de água: Tecnologia atualizada**. 1 ed. 6ª reimpressão: São Paulo: Blucher, p. 24-37, 2005.
- RIGO, E.; NINOW, J.L.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V. **Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements**. Food Science and Technology, p.1132-1137, 2010.
- ROCHA,C.P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2010.
- RODRIGUES, M.L.F.; DA SILVA, E.A.; BORBA, C.E., OLIVEIRA, A.C.D.; KRUGER, C.; RAIMUNDO, R. W.; SILVA, L.P.; VANZIN, M.; STUANI, B.T. **Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium sp.* Isolado das folhas de *Ricinus communis* L.** Revista Brasileira de Energias Renováveis, v.4, p. 129- 145, 2015.
- ROSA, D.R. **Tratamento enzimático/biológico de efluentes com alto teor de gordura**. 2004. 107 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. **Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2009.

ROSSET, I.G. **Produção de biodiesel empregando biocatálise via reações de esterificação e transesterificação.** Dissertação de Mestrado. USP, São Carlos-SP, 2011.

SABUDAK, T.; YILDIZ, M. **Biodiesel production from waste frying oils and its quality control.** Waste Management, v. 30, p. 799-803, 2010.

SALIHU, A.; ALAM, M.; **Solvent tolerant lipases: A review.** Process Biochemistry, v. 50, n.1, p.86-93, 2015.

SALLET, C.L. **Os biocombustíveis no Brasil e a relação entre os mercados agrícolas e de energia.** Programa de Pós-Graduação em Economia do Desenvolvimento, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SANTOS, D.T.; SARROUH B.F.; SANTOS J.C.; PEREZ, V.H.; SILVA, S.S. **Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia.** Janus, ano 3, n.4, p. 164-183, 2016.

SANTOS, A.M.M. **Tratamento de efluentes de biodiesel pelo processo combinado de coagulação-floculação e fenton.** Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

SCHRAG, J.; CYGLER, M. **Lipases and $\alpha\beta$ hydrolase fold.** Methods in Enzymology. V.284, p.85-107. 1997.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. **Production, purification, characterization and applications of lipases.** Biotechnology Advances, v. 19, p. 627-662, 2001.

SILVA, W.O.B.; MITIDIARI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H.; PICCIN, J.S.; MAGRO, F.G.; BRIÃO, V.B.; COLLA, L.M. Purificação de biodiesel por adsorventes: Uma Revisão. Vetor, Rio Grande, v.25, n.2, p. 68-75, 2015.

SILVA, B.M.; RONDON, N.J. **Utilização de fungos de bambu na Biorremediação de solo contaminado.** Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, v.10, 2013.

SILVA, T.A.R. **Biodiesel de Óleo Residual: Produção através da Transesterificação por Metanólise e Etanolise Básica, Caracterização Físico-Química e Otimização das Condições Reacionais.** 152 f. Tese de Doutorado em Química, Programa Multi-Institucional de Doutorado em Química (UFG/UFMS/UFU), Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

SILVA, J. **Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo b imobilizada para a síntese de ésteres de vitamina A.** 97 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2007.

SINGH, A.K. & MUKHOPADHYAY, M. **Overview of fungal lipase: a review.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

SIQUEIRA, L. A. **Água fonte de vida.** Monografia (Especialização em Ensino de Ciências). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2010.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S.; LETTI, L. A.; KARP, S. **Recent developments and innovations in solid state fermentation.** Biotechnology research & innovation. v.1, n.1, p.20. January. 2017.

STRINGARI, D. **Sistemática e Diversidade Genética de Isolados de *Guignardia spp.* e *Phyllosticta sp.* nos Estados do Paraná e São Paulo,** 2009. Universidade Federal do Paraná.

STUER, W.; JAEGER, E.; WINCLER, A. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **journal bacteriology. V.168, n.3, p.1070-1074. December. 1986.**

SUAREZ, P. A.Z.; MENEGHETTI, S.M.P.; MENEGHETTI, M.R.; WOLF, C.R. **Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica.** Química Nova, São Paulo, v. 30, n.3, p. 667-676, 2007.

SUAREZ, P.A.Z.; SANTOS, A.L.F.; RODRIGUES, J.P.; ALVES, M.B. **Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabiliza-los.** Química Nova, v. 32, p. 768 -775, 2009.

SUEHARA, K.; KAWKMOTO, Y.; FUJII, E. KOHDA, J.; NAKANO, Y.; YANO, T. **Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification.** Journal of Bioscience and Bioengineering, EUA, v. 100, n. 4, p. 437-442, 2005.

TAVARES. R.V. **Caracterização da água de lavagem proveniente da purificação do biodiesel.** Dissertação de mestrado em xxx, Universidade Federal da Paraíba, 2009.

TELLES, D.D.; COSTA, R P. **Reuso da água.** 2ª Edição. Editora Edgard Blücher Ltda, 2010.

TOMASSONI, F., SANTOS, R.F., SANTOS, F.S., CARPINSKI, M., SILVEIRA, L.. **Técnica de biorremediação do solo.** Acta Iguazu (Online), Cascavel, v.3, n.3, p. 46-56. 2014.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 8ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 772 p., 2005.

TREICHEL, H. **Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium sp.* in solid state and submerged fermentation: A comparative study.** LWT - Food Science and Technol, v. 42, p. 1557-1560, 2009.

VALENTE. J, PADILHA P, SILVA. A. **Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu – SP.** Eclética Química, v. 22, p. 49-66, 1997.

Verma N, Thakur S and Bhatt AK. Microbial lipases: Industrial applications and properties: A review. Int Res J Biol Sci 1: 88-92, 2012

VON SPERLING, Marcos. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 3.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais; p. 15 - 48. 2005.

ZENEBO, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 2008.

ZUCCARI, M. L.; GRANER, C.A.F.; LEOPOLDO, P.F. **Determinação da demanda química de oxigênio (DQO) em águas e efluentes por método colorimétrico alternativo.** Engenharia Agrícola, v. 20, n. 4, p. 69-82, 2005.